

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 8 月 8 日 (08.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/060978 A1

(51) 国際特許分類⁷: C08G 65/329,
C07K 14/535, 14/56, 14/565, 16/18, A61K 38/02, 38/43,
38/19, 38/22, 47/34, 47/48, C12N 9/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/00709

(22) 国際出願日: 2002 年 1 月 30 日 (30.01.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-21616 2001 年 1 月 30 日 (30.01.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和
醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一
丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山崎 基生 (YA-
MASAKI, Motoo) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市
旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内 Tokyo (JP). 須澤 敏行 (SUZAWA, Toshiyuki)
[JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番
6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).
村上 達也 (MURAKAMI, Tatsuya) [JP/JP]; 〒194-8533
東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株

式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 櫻井 紀子 (SAKU-
RAI, Noriko) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大
手町一丁目 6 番 1 号 協和醗酵工業株式会社 本社内
Tokyo (JP). 山下 錦也 (YAMASHITA, Kinya) [JP/JP]; 〒
411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和
醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).
向井 真由美 (MUKAI, Mayumi) [JP/JP]; 〒411-8731 静
岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業
株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 桑原 隆
(KUWABARA, Takashi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿
東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式会社
医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: BRANCHED POLYALKYLENE GLYCOLS

(54) 発明の名称: 分岐型ポリアルキレングリコール類

(57) Abstract: Branched polyalkylene glycols which comprise at least three single-chain polyalkylene glycols bonded to each other and have a group reactive with an amino acid side chain, an N-terminal amino group or a C-terminal carboxyl group in a polypeptide or a group which can be converted into the reactive group as described above attached thereto; and physiologically active polypeptides modified by these branched polyalkylene glycols.

(57) 要約:

1本鎖ポリアルキレングリコール類が3本以上結合し、かつポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類、および上記の分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドを提供する。

WO 02/060978 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

分岐型ポリアルキレングリコール類

技術分野

本発明は、生理活性を有するポリペプチド（生理活性ポリペプチド）の修飾剤として有用な分岐型構造を有するポリアルキレングリコール類および該ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドに関する。さらに、該ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドを含有する医薬に関する。

背景技術

生理活性ポリペプチドは特定の疾病に対する治療剤として有用であるが、血中に投与されると安定性が悪く、十分な薬理効果が期待できない場合が多い。例えば、分子量が60,000程度以下の生理活性ポリペプチドは血中に投与されても腎臓の糸球体より濾過され、大部分が尿中に排泄されるため、治療剤として用いられたとしても大きな治療効果が得られず、繰り返しの投与が必要になる場合が多い。また、他の生理活性ポリペプチドは血中に存在する加水分解酵素等によって分解され、生理活性を失うことがある。さらに、外因性の生理活性ポリペプチドにおいてもその生理活性が疾患の治療に有効なことがあるが、そのような外因性の生理活性ポリペプチドや遺伝子組換えによって製造された生理活性ポリペプチド等は内因性の生理活性ポリペプチドと構造が異なるために、血中に投与された場合には免疫反応を誘発し、アナフィラキシーショック等の重篤な副作用を起こす場合があることが知られている。さらに、生理活性ポリペプチドによってはそれが治療剤として用いられる際に、溶解性が悪い等の物性面が問題になることも多い。

生理活性ポリペプチドを治療剤として用いる際のこれらの問題を解決する方法の一つとして、1分子以上の不活性型ポリマー鎖を生理活性ポリペプチドに化学的に結合させる方法が知られている。多くの場合、ポリエチレングリコール等のポリアルキレングリコール類を該ポリペプチドに化学的に結合させることによって、該

ポリペプチドや蛋白質に望ましい特性が付与されている。

例えば、ポリエチレングリコールで修飾されたスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) では血中の半減期が著しく延長され、作用の持続性が見出されている [ファーマシューティカル リサーチ コミュニケーション (Pharm. Res. Commun.)、19巻、287頁 (1987年)]。また、顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF) のポリエチレングリコール修飾も知られている [ジャーナル オブ バイオケミストリー (J. Biochem.)、115巻、814頁 (1994年)]。その他にもアスパラギナーゼ、グルタミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウリカーゼ等のポリエチレングリコール修飾ポリペプチドの例がGillian E. Francisらによってまとめられている [ファーマシューティカル バイオテクノロジー (Pharm. Biotechnol.)、3巻、Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B、235頁 (1992年)、Plenum Press、New York]。また、生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコールで修飾することによって得られる効果としては、熱安定性が高まること [生物物理、38巻、208頁 (1998年)]、有機溶媒に可溶となること [バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun. : BBRC)、122巻、845頁 (1984年)] 等も知られている。

一方、ペプチドや蛋白質とポリアルキレングリコールとの結合方法についても、例えばポリアルキレングリコールの末端にカルボン酸の活性エステル、マレイミド基、カーボネート、塩化シアヌル、ホルミル基、オキシラニル基等を導入してポリペプチドのアミノ基やチオール基に結合する方法が知られている [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)]。これらの技術の中には、生理活性ポリペプチドの特定のアミノ酸残基に特異的にポリエチレングリコールを結合し、該ペプチドまたは蛋白質の生物活性を損なわずに血中安定性を向上させた例も含まれる。生理活性ポリペプチド中のアミノ酸残基特異的なポリエチレングリコール修飾の例としては、成長ホルモン放出因子 (Growth Hormone-Releasing Factor) のカルボキシ末端にノルロイシンのスペーサーを介してポリエチレングリコールを結合した例 [ジャーナル オブ ペプチド リサーチ (J. Peptide Res.)、49巻、527頁 (1997年)]、インターロイキン-2の3位に遺伝子組

換えによってシステインを導入しこの部位に特異的にポリエチレングリコールを結合した例 [バイオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY)、8巻、343頁 (1990年)] 等が知られている。

前記ポリアルキレングリコール修飾ポリペプチドの多くは、直鎖型のポリアルキレングリコールを結合させる方法により得られるが、高活性の化学修飾ポリペプチドを得る方法として、分岐型ポリエチレングリコールを結合させる方法が優れていることが見出されている。一般的に、ポリアルキレングリコールの分子量が大きいほど、あるいは修飾率が高いほど化学修飾ポリペプチドの血中持続性は向上することが知られているが [ザ・ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、263巻、15064頁 (1988年)]、修飾率を高くすると生理活性ポリペプチドの生理活性が損なわれる場合がある。これは、生理活性に必要な生理活性ポリペプチド中の特定のアミノ基やチオール基等が化学修飾剤によって修飾されることが一つの原因である。修飾率に応じて生理活性が低下する例としてはインターロイキン-15が知られている [ザ・ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、272巻、2312頁 (1997年)]。

一方、分子量の大きいポリアルキレングリコール類では、分子量分布が均一かつ純度の高いものを合成することが困難である。例えば、モノメトキシポリエチレングリコールの場合、不純物としてジオール成分の混入が知られている。そこで、現在利用できる分子量分布が狭くて高純度のポリアルキレングリコール類を分岐させることによって分子量の大きい修飾剤を調製しようとする試みが行われている。これによって、修飾率を低減しても高い持続性を保持したまま高い生理活性を有する化学修飾ポリペプチドが得られる。また、ポリアルキレングリコール類を分岐させることで生理活性ポリペプチド分子のより多くの表面をポリアルキレングリコール類で覆うことができると考えられている。例えば、分岐構造を有する基に塩化シアヌルを利用した2本鎖型のポリエチレングリコール誘導体が知られている (特開平3-72469、特開平3-95200)。この場合、平均分子量5,000のメトキシポリエチレングリコールが利用されているが、この化合物ではトリアジン環由来の毒性が懸念される。また、特開平1-153088には、ポリエチレングリコールと無水マレイン酸の

共重合体である櫛形ポリエチレングリコールからは直鎖型ポリエチレングリコールと比較して低い修飾率で高活性の化学修飾ポリペプチドが得られることが開示されているが、この化合物ではポリペプチドとの反応サイトが多数存在するため生理活性ポリペプチドの生理活性を損なうばかりでなく、分子量分布が均一ではない。また、桂皮酸を原料に用いベンゼン環を介してポリエチレングリコールを2本分岐させた例（特開平3-88822）、リジンを原料に用い、ポリエチレングリコールを2本分岐させた例（WO96/21469、US 5,643,575）等も知られている。

以上の例に示されるようにポリアルキレングリコール類を2本分岐させた構造の化合物は知られているが、3本以上分岐させた構造の化合物は製造されていない。なお、US 5,643,575には水溶性で非抗原性のポリマーを3分岐した化合物が示唆されているが、3分岐した構造の化合物の製造方法および具体的な実施例等に関しては何ら開示されておらず、3分岐化合物の優れた効果に関しても何ら知見が得られていない。

生理活性ポリペプチドの活性を低下させずに、腎臓の糸球体での濾過が抑制され、より持続性に優れた化学修飾ポリペプチドが求められている。また、そのような性質を発揮する化学修飾ポリペプチドを製造するための、毒性が低く、安定性が改善され、分子サイズの増大効果に優れた分子量分布が狭く均一な修飾剤が求められている。

発明の開示

本発明の目的は、第一に生理活性ポリペプチドの化学修飾剤として分子サイズを増大させる効果に優れたポリアルキレングリコール鎖を有する分岐型の化学修飾剤を提供することにある。第二には、該分岐型のポリアルキレングリコールで修飾された生理活性ペプチドを提供することにある。

本発明者らは、生理活性ポリペプチドを修飾するための新規構造を有する分岐型ポリアルキレングリコール修飾試剤について鋭意検討した。その結果、ポリアルキレングリコール類を3本以上分岐させることで、従来知られている直鎖型あるいは2本鎖型ポリアルキレングリコール類以上の分子サイズ増大効果を有する修飾試剤

が得られることを見出した。さらに、生理活性ポリペプチドを上記分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾したところ、3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール修飾生理活性ポリペプチドにおいては、該生理活性を保持したまま、従来の直鎖型あるいは2本鎖型ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドに比べ、予想以上に腎臓の糸球体での濾過が抑制され、血中持続性が著しく向上されることを見出した。

以上のように、前記分岐型ポリアルキレングリコール類が化学修飾剤として優れていることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は3本以上の1本鎖ポリアルキレングリコール類が結合し、かつポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体の該ポリアルキレングリコール修飾体、および該ポリアルキレングリコール修飾体を含有する医薬あるいは治療剤を提供するものである。また、別の観点からは、本発明は、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が少なくとも1個の上記ポリアルキレングリコール類で直接もしくはスペーサーを介して修飾された化学修飾ポリペプチド、および該化学修飾ポリペプチドを含有する医薬あるいは治療剤に関する。

以下に、本発明を詳細に説明する。

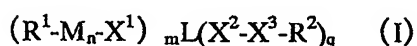
本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類としては、1本鎖ポリアルキレングリコール類が3本以上結合し、かつ、ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合していれば、いかなる分岐型ポリアルキレングリコール類も包含される。好ましくは1本鎖ポリアルキレングリコール類が3本以上結合し、かつ、ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が1〜3個所結合している分岐型ポリアルキレングリコール類、さらに好ましくは1本鎖ポリアルキレングリコール類が3本〜4本結合し、かつ、ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な

基が1個所結合している分岐型ポリアルキレングリコール類があげられる。

1本鎖ポリアルキレングリコール類としては、1本鎖ポリアルキレングリコール類であればいかなるものも包含されるが、好ましくは $R^1-M_n-X^1$ （式中、M、n、 R^1 および X^1 は下記と同義である）があげられる。

ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基としては、ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基、あるいは該反応性を有する基に変換可能な基であればいかなるものも包含される。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類として好ましくは、式 (I)



{式中、Lは4以上分岐が可能な基を表し、

Mは OCH_2CH_2 、 $OCH_2CH_2CH_2$ 、 $OCH(CH_3)CH_2$ 、 $(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s$ （式中、rおよびsは同一または異なって、任意の正の整数を表す）または

$(OCH_2CH_2)_n-[OCH(CH_3)CH_2]_{sa}$ （式中、raおよびsaはそれぞれ前記rおよびsと同義である）を表し、

nは任意の正の整数を表し、

mは3以上の整数を表し、

qは1~3の整数を表し、

R^1 は水素原子、低級アルキルまたは低級アルカノイルを表し、

R^2 はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表し、

X^1 は結合、O、S、アルキレン、 $(OCH_2)_{ta}$ （式中、taは1~8の整数を表す）、 $(CH_2)_{tb}O$

（式中、tbは前記taと同義である）、 NR^3 （式中、 R^3 は水素原子または低級アルキルを表す）、 $R^4-NH-C(=O)-R^5$ [式中、 R^4 は結合、アルキレンまたは $O(CH_2)_{tc}$ （式中、tcは前記taと同義である）を表し、 R^5 は結合、アルキレンまたは OR^{5a} （式中、 R^{5a} は結合またはアルキレンを表す）を表す]、 $R^6-C(=O)-NH-R^7$ [式中、 R^6 は結合、アルキレンまたは $R^{6a}O$ （式中、 R^{6a} は前記 R^{5a} と同義である）を表し、 R^7 は結合、アルキ

レンまたは $(\text{CH}_2)_{td}\text{O}$ (式中、 td は前記 ta と同義である)を表す]、 $\text{R}^8\text{-C(=O)-O}$ (式中、 R^8 は前記 R^{5a} と同義である) または O-C(=O)-R^9 (式中、 R^9 は前記 R^{5a} と同義である)を表し、

X^2 は結合、 O または $(\text{CH}_2)_{te}\text{O}$ (式中、 te は前記 ta と同義である)を表し、

X^3 は結合またはアルキレンを表し、

3つ以上の $\text{R}^1\text{-M}_n\text{-X}^1$ はそれぞれ同一でも異なってもよく、 $\text{X}^2\text{-X}^3\text{-R}^2$ が2または3個存在する場合 (q が2または3である場合) には、それらは同一でも異なってもよい} で表される化合物 [以下、式 (I) で表される化合物を化合物 (I) と称する。他の式番号の化合物についても同様とする] があげられる。

式 (I) の各基の定義において、低級アルキルおよび低級アルカノイルの低級アルキル部分は、直鎖状または分岐状の炭素数1~8の、例えばメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等を包含する。アルキレンは、炭素数1~8の、例えばメチレン、エチレン、 n -プロピレン、イソプロピレン、 n -ブチレン、イソブチレン、 sec -ブチレン、 $tert$ -ブチレン、ペンチレン、ネオペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン等を包含する。

式 (I) において、 M は OCH_2CH_2 、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ 、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_s$ (式中、 r および s は同一または異なって、任意の正の整数を表す) または $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{ra}[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_{sa}$ (式中、 ra および sa はそれぞれ前記 r および s と同義である) を表し、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_s$ (式中、 r および s はそれぞれ前記と同義である) または $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{ra}[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_{sa}$ (式中、 ra および sa はそれぞれ前記と同義である) である場合、 r および s 並びに ra および sa は、好ましくは1~100,000であり、さらに好ましくは1~1,000である。

式 (I) において、 n は任意の正の整数を表し、好ましくは10~100,000であり、さらに好ましくは100~1,000である。

M_n で表されるポリアルキレングリコール部分の平均分子量は、約1,000~1,000,000が好ましく、5,000~100,000がさらに好ましい。 M_n が $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ である場合、原料となるポリエチレングリコール類は M_w (重量平均分子量) / M_n (数平均

分子量)で表される分子量分布が1.1以下の単分散のものが望ましく、平均分子量30,000以下であれば市販のものを用いることができる。例えば、平均分子量が2,000、5,000、10,000、12,000、20,000等のモノメトキシポリエチレングリコールが利用できる。

式(I)において、 q は1~3の整数を表し、好ましくは1である。

式(I)において、 m は3以上の整数を表し、好ましくは3~4である。

式(I)で表される分岐型ポリアルキレングリコール類の分子量は、500~1,000,000の範囲にあることが好ましい。

式(I)において、 L は4以上分岐が可能な基であり、 L 上の置換基として、水酸基、置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、カルボキシ、シアノまたはホルミル等を有していてもよい。ここで、低級アルキルおよび低級アルコキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義であり、置換低級アルキルにおける置換基としては、水酸基、アミノ、低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルカルバモイル、低級アルキルカルバモイルオキシ等があげられる。低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルカルバモイルおよび低級アルキルカルバモイルオキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。

L で表わされる4以上分岐が可能な基としては、 X^2-X^3 を介してポリペプチド中のアミノ酸側鎖、 N 末端アミノ基または C 末端カルボキシル基と反応性を有する基に変換可能な基、あるいは該反応性を有する基を結合でき、 X^1 を介して1本鎖ポリアルキレングリコール類を3分子以上分岐させることができればいかなる基を用いてもよい。 L としては、例えばポリオール類、ポリカルボン酸等で、分子量1,000以下の化合物から水素原子4個以上を除いた基があげられる。ポリオール類の具体例としては、グルコース、 D 、 L -ソルビトール、リボース、エリスリトール、ペンタエリスリトール、トリシン(Tricine、 N -[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine)、イノシトール、コール酸、3,4,5-トリヒドロキシベンゾイックアシッド

(3,4,5-Trihydroxybenzoic acid, Gallic acid)、2, 4, 6-トリヒドロキシベンゾイックアシッド、3, 4, 5-トリヒドロキシベンズアルデヒド、キナ酸 (Quinic acid)、シキミ酸 (Shikimic acid)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン等の低分子化合物およびそれらの立体異性体等があげられ、ポリカルボン酸の具体例としては、1, 4, 5, 8-ナフタレンテトラカルボン酸、ピロメリト酸、ジエチレントリアミンペンタアセティックアシッド、1, 2, 3, 4-ブタンテトラカルボン酸、クエン酸、γ-カルボキシグルタミン酸等の低分子化合物およびそれらの立体異性体等があげられる。

Lとして好ましい基としては、トリシンから水素原子4個以上を除いた基、シキミ酸から水素原子4個以上を除いた基、キナ酸から水素原子4個以上を除いた基、エリスリトールから水素原子4個以上を除いた基、ペンタエリスリトールから水素原子4個以上を除いた基およびグルコースから水素原子4個以上を除いた基等があげられる。

L部分の構造の構築は、例えば市販品の化合物をそのまま利用するか、一般の有機合成法によってポリアルキレングリコール類の結合に適した形に誘導体化して利用するか、あるいは官能基の保護を行った後に利用して行うことができる [日本化学会編、実験化学講座 第4版 (1992年)、有機合成I~V、丸善、プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年) 等]。

上記で例示した以外のシクロヘキサン類は、例えば木曾ら [大有機化学、第6巻、183頁 (1958年)、朝倉書店] またはG. E. McCaslandとE. Clide Horswill [ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイティ (Journal of American Chemical Society)、76巻、2373頁 (1954年)] の方法等に従って合成することができる。

化合物 (I) において、 X^1 を介したポリアルキレングリコール類とLとの結合は通常の有機合成法で知られている反応を容易に組み合わせて行うことができる [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19-23頁 (1992年)、有機合成I~V、丸善]。

式 (I) において、 R^2 はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を

表す。

すなわち、上記反応性を有する基としては、ポリペプチド中の、リジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン等の各側鎖、N末端アミノ基、C末端カルボキシル基のいずれかと反応性を有する基が包含され、例えば水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホニル、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アルカノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレシル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィド、アジド等があげられる。

上記の各基の定義において、低級アルコキシカルボニルオキシ、ハロゲン化低級アルキル、低級アルカノイルオキシおよび低級アルカノイルオキシカルボニルの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。アリールオキシカルボニル、アリールオキシカルボニルオキシおよびアリールジスルフィドのアリール部分としては、炭素数6~14の、例えばフェニル、ナフチル、ビフェニル、アントリル等があげられる。アロイルオキシカルボニルのアロイル部分としては、炭素数7~13の、例えばベンゾイル、ナフトイル、フタロイル等があげられる。ハロゲン化カルボニルおよびハロゲン化低級アルキルのハロゲン部分としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子があげられる。

置換低級アルコキシカルボニルオキシにおける置換基としては、同一または異なって置換数1~3の、例えば、水酸基、カルボキシ、ハロゲン等があげられる。ここで、ハロゲンは、前記と同義である。

置換アリールオキシカルボニル、置換アリールオキシカルボニルオキシ、置換アリールジスルフィドおよび置換アロイルオキシカルボニルにおける置換基として

は、同一または異なって置換数1～3の、例えば水酸基、カルボキシ、ハロゲン、シアノ、低級アルキル等があげられる。ここで、ハロゲンおよび低級アルキルは、それぞれ前記と同義である。

R^2 で表される基は、L部分の構造を構築する原料に含まれていてもよいし、該原料化合物中の必要な官能基をあらかじめ適当な保護基〔PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第2版、JOHN WILEY & SONS, INC. (1991年) 等〕で保護し、 X^1 を介してポリアルキレングリコール類をLに結合して分岐させた後に脱保護、さらには必要により変換して形成してもよい。さらにポリアルキレングリコール類を X^1 を介してLから分岐させた後に、通常の有機合成法によってLに必要により X^2 または X^3 を介して前記 R^2 を導入することもできる。

より具体的には、例えば以下の製造法で本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類を製造することができる。なお、本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類の製造法は、これらに限定されるものではない。

製造法1： X^1 が結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{ta}$ または $(CH_2)_{tb}O$ である化合物の製造
化合物(I)のうち、 X^1 が結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{ta}$ （式中、 ta は前記と同義である）、または $(CH_2)_{tb}O$ （式中、 tb は前記と同義である）である化合物(Ia)は、例えば以下の方法により製造することができる。

水酸基を3個所以上有するポリオール類を、無水状態でN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1～30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、ポリアルキレングリコールまたはそのモノアルキルエーテルもしくはモノカルボン酸エステル（以下、これらをまとめてポリアルキレングリコール類Aという）のハロゲン化物もしくはトシル化物を3モル以上加えて、 $-20\sim 150^\circ\text{C}$ で1時間～10日間反応させて、3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物が得られる。

ポリオール類はキナ酸、グルコース、ソルビトール、リボース、エリスリトール、ペンタエリスリトール、トリシン、イノシトール等の市販の化合物、または市販の

化合物から導かれる化合物等から選ばれる。市販の化合物から導かれる化合物としては、例えばエチレンジアミンテトラ酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸 (1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid)、 γ -カルボキシグルタミン酸 (γ -carboxyglutamic acid) 等から選ばれるポリカルボン酸を通常の有機合成法 [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19~21巻 (1992年)、丸善] に従って適当な還元剤で還元することによって得られるポリオール類等があげられる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

ポリオール類中の水酸基の配置は何れでもよく、反応に不必要な官能基を PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 第2版、JOHN WILEY & SONS, INC. (1991年) 等に記載の方法によって適当に保護、あるいは誘導体化してから、反応に使用することができる。

ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物およびトシル化物はSamuel Zalipskyの総括 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)] 等に記載された各種の方法で容易に製造することができる。結合に使用するポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物およびトシル化物としては分子量分布が均一であれば (好ましくは、 M_w/M_n が1.1以下) いかなる平均分子量のものも用いられる。

得られた3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物はそのままの純度、あるいはイオン交換クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法で3本鎖、4本鎖、5本鎖、またはそれ以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を分岐数に応じて任意の純度に精製、単離して、次のステップに用いることができる。ここまでの工程で、化合物 (Ia) のうち、 R^2 が水酸基である化合物 (Iaj) のいくつかが得られる。

一方、ポリハライド類またはポリトシル類とポリアルキレングリコール類Aを使用することによっても目的の3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を調製することができる。この場合、3モル相当以上のポリアルキレングリコール類AをN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフ

ラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1モルのポリアルキレングリコール類Aあたり1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1モル相当のポリハライド類またはポリトシル類を加えて、-20~150°Cで1時間~10日間反応させて目的物が得られる。

ポリハライド類は市販の化合物であるか、前記ポリオール類をハロゲン化合物に変換〔日本化学会編、実験化学講座、第4版、19巻（1992年）、丸善〕して得られる。ポリトシル類はポリオール類をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、水酸基当たり1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン、カリウムナフタレン等の適当な塩基の存在下、水酸基当たり1~3モル相当のハロゲン化トシルを加えて、-20~150°Cで1時間~数日間反応させることで得ることができる。

次に、得られた3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物または精製化合物に、 R^2 を導入する。 R^2 としては、ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物をポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類に結合した後、ポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類に残存している官能基をそのまま利用するか、あるいはあらかじめポリオール類に結合している官能基を保護しておき、ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合後、官能基の保護基を除去して得られる基を利用してもよい。この場合、前記ポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類中の1個所以上の水酸基、または他の官能基を適当な保護基で保護した後、前記と同様の方法で残りの水酸基、ハロゲンまたはトシル基部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を導入し、3本以上のポリアルキレングリコールが結合した化合物を合成し、保護基を除去した官能基をそのまま利用するか、あるいは該官能基の少なくとも一つを後述する方法に従って R^2 に変換する。ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合する前、もしくは結合した後にポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類に存在する官能基としては、水酸基の他に、カルボキシ、アミノ、ハロゲン、

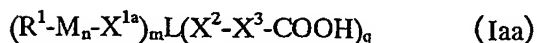
シアノ、ホルミル、カルボニル等がある。適当な官能基の保護基としては水酸基の場合、ベンジル、tert-ブチル、アセチル、ベンジロキシカルボニル、tert-ブチロキシカルボニル、ジメチルtert-ブチルシリル、ジフェニルtert-ブチルシリル、トリメチルシリル、トリフェニルシリル、トシル、テトラヒドロピラニル等があげられ、アミノの場合、メチル、エチル、9-フルオレニルメチロキシカルボニル、ベンジロキシカルボニル、ニトロベンジロキシカルボニル、N-フタルイミド、アセチル、tert-ブチロキシカルボニル等があげられ、カルボキシの場合、ベンジル、メチル、エチル、tert-ブチル、9-フルオレニルメチル、メトキシエトキシメチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、シンナモイル、アリル、ニトロフェニル等があげられ、ホルミルの場合、ジメチルアセタール、ジエチルアセタール、ジベンジルアセタール、1,3-ジオキサニル等があげられる [PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 第2版, JOHN WILEY & SONS, INC.(1991年)]。

あらかじめ存在する官能基をそのまま、または保護、脱保護してR²として利用でき、L部分の構造を構築する原料となるポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類の具体例としては、シキミ酸、キナ酸、3,4,5-トリヒドロキシベンゾイックアシッド、コール酸またはこれらのハライド、トシル化物等があげられる。

化合物 (I) のうち、Lを含む化合物に新たに置換基R²を導入して得られる化合物の場合、例えば以下の製造方法で容易に製造を行うことができる。

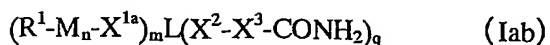
製造法 1 - 1

化合物 (Ia) のうち、R²がカルボキシである式 (Iaa)



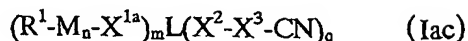
(式中、X^{1a}は結合、O、アルキレン、O(CH₂)_mまたは(CH₂)_mOを表し、R¹、L、M、n、m、q、X²およびX³はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物、

R²がカルバモイルである式 (Iab)



(式中、R¹、L、M、n、m、q、X^{1a}、X²およびX³はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物、

R^2 がシアノである式 (Iac)



(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 m 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は例えば以下のように合成することができる。

化合物 (Iaa)、化合物 (Iab) および化合物 (Iac) は、ポリオール類を用いて、例えば製造法 1 に従って得られる化合物 (Ia) のうち、 R^2 として水酸基を有する化合物 (Iaj) を含む反応混合物または精製化合物を水、塩化メチレン、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒中、触媒量または1~20%の塩基存在下、1~30モル相当のアクリル酸、アクリルアミド、アクリロニトリル等と、-20~150°Cで1時間~数日間反応させて得ることができる。塩基としては、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水素化ナトリウム等があげられる。また、化合物 (Iaa) は、例えば製造法 1 で得られる化合物 (Iaj) を含む反応混合物または精製化合物を無水状態で *N,N*-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モル相当の α -ハロゲン化酢酸エステルと、-20~150°Cで1時間~数日間反応させた後、加水分解して得ることもできる。さらに、化合物 (Iaa) は、例えば製造法 1 で得られる化合物 (Iaj) を *N,N*-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モルのスクシンイミジルカーボネート、*p*-ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、-20~100°Cで1時間~10日間反応させて活性化し、その後、 γ -アミノ酪酸、グリシン、 β -アラニン等のアミノ酸またはその誘導体と反応させることによっても得られる。

また、製造法 1 で得られる化合物 (Iaj) を前記同様の塩基存在下、無水コハク酸、無水グルタル酸等の酸無水物と反応させることによっても化合物 (Iaa) を製造することができる。

また、化合物 (Iaa) は、例えばポリハライド類を用いて製造法 1 に従って、化合

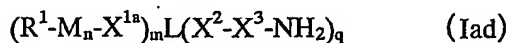
物 (Ia) のうち R^2 がハロゲン化低級アルキルである化合物 (Iai) を製造した後、ヒドロキシカルボン酸エステル、マロン酸エステル、 γ -アミノ酪酸のエステル体、 β -アラニンのエステル体、グリシンのエステル体等を N,N -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、化合物 (Iai) を加え、 $-20 \sim 150^\circ\text{C}$ で1時間~数日間反応を行った後、加水分解して得ることもできる。

さらに、化合物 (Iaa) は、例えば前記ポリオール類もしくはポリハライド類の一個所以上の水酸基またはハロゲンを、あらかじめカルボン酸あるいはカルボン酸の保護体を含む残基で置換し、これを用いて製造法 1 で示した方法でポリオール類もしくはポリハライド類の残りの3個所以上の水酸基またはハロゲンをポリアルキレングリコール類 A またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物で置換することで得ることもできる。この場合、カルボン酸またはカルボン酸の保護体を含む残基の導入は、前記と同様にして行うことができる。カルボン酸を保護した場合には、ポリアルキレングリコール類 A またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物をポリオール類もしくはポリハライド類に導入した後に脱保護して遊離カルボン酸を生成させる。

カルボン酸に変換された化合物は、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法で、任意の純度で精製、単離することができる。

製造法 1-2

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がアミノである式 (Iad)



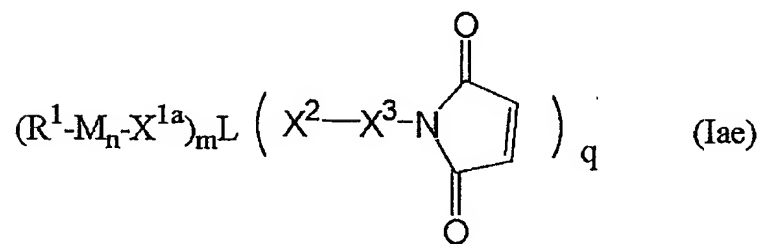
(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 m 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は、例えば製造法 1-1 で得られる化合物 (Iac) に適当な還元剤を作用させて得られる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

また、化合物 (Iad) は、例えば製造法 1 で得られる化合物 (Iai) または化合物 (Iai) 中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物に 5 当量～過剰量のエチレンジアミン、プロピレンジアミン等のジアミン類を適当な塩基存在下で反応させることによっても得られる。

さらに、製造法 1-1 で示したのと同様に、化合物 (Iad) は、例えば化合物 (Iaj) を N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1～50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1～50モルのスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、-20～100℃で1時間～10日間反応させて活性化し、その後、1当量～過剰量のエチレンジアミンやプロピレンジアミン等のジアミン類と適当な塩基存在下で反応させることによっても得られる。

また、化合物 (Iad) は、例えば製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ L を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に 1 個所以上のアミノまたはアミノの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類 A またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を 3 個所以上置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Ia) のうち、R²がマレイミドである式 (Iae)



(式中、R¹、L、M、n、m、q、X^{1a}、X²およびX³はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は、例えば Oskar Keller らの方法 [ヘルベチカ キミカ アクタ (Helv. Chim. Acta)、58巻、531頁 (1975年)] または Timothy P. Kogan らの方法 [シ

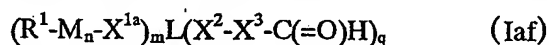
ンセティック コミュニケーション (Synthetic Commun.)、22巻、2417頁 (1992年)] に従い、化合物 (Iad) とN-アルコシカルボニルマレイミドとを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中で反応させることで得ることができる。N-アルコシカルボニルマレイミドとしてはN-エトシカルボニルマレイミドやN-メトシカルボニルマレイミドを用いることができる。

また、化合物 (Iae) は、例えば製造法1で示した方法に準じ、あらかじめLを形成させるために利用するポリオール類等の化合物に1個所以上のマレイミドを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を3個所以上置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Iad)、化合物 (Iae) およびそれらの合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

製造法 1-3

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がホルミルである式 (Iaf)



(式中、 R^1 、L、M、n、m、q、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は、例えば製造法1で得られる化合物 (Ia) のうち R^2 としてヒドロキシメチルを有する化合物 (Iag) を適当な酸化剤で酸化することで得られる。酸化剤としては塩化クロム酸ピリジニウム、クロム酸、銀イオン、ジメチルスルホキシド等があげられる。また、化合物 (Iaa) を前記と同様に適当な還元剤で還元することによっても得ることができる。

また、例えば製造法1で得られる化合物 (Iaj)、化合物 (Iai) または化合物 (Iai) 中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物にアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール、ハロゲン化エチルアセタール、ハロゲン化メチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

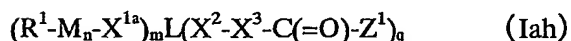
同様にして、製造法 1 で得られる化合物 (Iaj) を用い、製造法 1-1 で示した方法に準じて水酸基を活性化し、続いてアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

また、化合物 (Iaf) は、例えば製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ L を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に 1 個所以上のアルデヒド、あるいはアルデヒドの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類 A またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を 3 個所以上置換させる方法でも得られる。

化合物 (Iaf) およびその合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

製造法 1-4

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がハロゲン化カルボニルである式 (Iah)

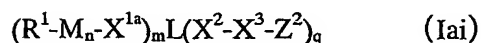


(式中、 Z^1 はハロゲンを表し、 R^1 、L、M、n、m、q、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は、例えば R^2 がカルボキシである化合物 (Iaa) をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、 $0 \sim 150^\circ\text{C}$ で 1~24 時間加熱することによって得られる。

ハロゲン化カルボニルにおけるハロゲンは前記ハロゲンと同義である。

製造法 1-5

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がハロゲン化低級アルキルである式 (Iai)



(式中、 Z^2 はハロゲン化低級アルキルを表し、 R^1 、L、M、n、m、q、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は、例えば R^2 が水酸基である化合物 (Iaj) をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチ

ルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0～150℃で1～24時間加熱することによって得られる。ハロゲン化低級アルキルにおけるハロゲンおよび低級アルキル部分はそれぞれ前記と同義である。

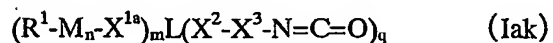
また、化合物 (Iai) は、例えば製造法 1 で得られる化合物 (Iaj) または R^2 がアミノである化合物 (Iad) に、前記同様適当な塩基存在下、5当量～過剰量のジブロモエタンやジブロモプロパン等のジハロゲン化アルキル類を反応させることによって得られる。

さらに、化合物 (Iai) は、例えば前記製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ L を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に 1 個所以上のハロゲン化低級アルキルを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類 A またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を 3 個所以上置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Iai) およびその合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

製造法 1 - 6

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がイソシアナートである式 (Iak)

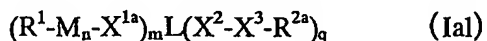


(式中、 R^1 、L、M、n、m、q、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は、例えば、化合物 (Iad) をトルエン、テトラヒドロフラン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、ホスゲンまたは塩化オキサリルと 0～150℃で 1～24 時間反応させるか、 N,N' -カルボニルジイミダゾールと反応させた後に室温で分解させて得られる。

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がイソチオシアナート ($-N=C=S$) である化合物 (Iap) はホスゲンの代わりにチオホスゲンを用いる以外は上記の方法に従って製造することができる。

製造法 1-7

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルである式 (Ial)



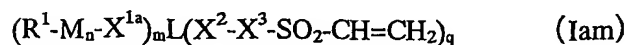
(式中、 R^{2a} はスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルを表し、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 m 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、通常のエステル合成方法に従って製造することができる。

例えば、化合物 (Iaa) 1モルに対し、N-ヒドロキシスクシンイミド、置換もしくは非置換の水酸化アリール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたはN-ヒドロキシフタルイミド1~10モルを、1~10モルのN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤存在下、ジメチルホルムアミド、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中、-20~100℃で1~24時間反応させることによって目的物を得ることができる。より詳しくは、A. Fradetら [ポリマー ブルチン (Polym. Bull.)、4巻、205頁 (1981年)]、またはK. Geckelerら [ポリマー ブルチン (Polym. Bull.)、1巻、691頁 (1979年)] によるポリアルキレングリコールの末端にカルボキシル基を導入する方法、カルボキシメチルポリアルキレングリコールのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの製造方法等に準じて得ることができる。

ここで、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルは前記と同義である。水酸化アリールのアリール部分はアリールオキシカルボニルのアリール部分と同義であり、置換水酸化アリールの置換基は、置換アリールオキシカルボニルの置換基と同義である。

製造法 1-8

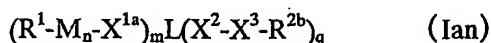
化合物 (Ia) のうち、 R^2 がビニルスルホニルである式 (Iam)



(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 m 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば化合物 (Iaj) を用いて Margherita Morpurgo らの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Biocónjugate Chem.)、7巻、363頁 (1996年)] で製造することができる。

製造法 1 - 9

化合物 (Ia) のうち、 R^2 が置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである式 (Ian)



(式中、 R^{2b} は置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシを表し、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 m 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば Talia Miron と Meir Wilchek の方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、4巻、568頁 (1993年)] に準じて、 R^2 が水酸基である化合物 (Iaj) と過剰量の *p*-ニトロフェニルクロロホルメート、エチルクロロホルメート等とをジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン等の塩基存在下で反応させることで得られる。

また、化合物 (Ian) は、例えば製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ L を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に 1 個所以上の置換もしくは非置換のアルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類 A またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を 3 個所以上置換させる方法で得ることもできる。

化合物 (Ian) およびその合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

ここで、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシはそれぞれ前記と同義である。

製造法 2: X^1 が S である化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 がSである化合物 (Ib) は、例えば製造法1と同様に、ポリオール類をポリハライド類に変換した化合物 [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19巻 (1992年)、丸善] または市販のポリハライド類と、ポリアルキレングリコール類Aのチオール誘導体とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させることによって得ることができる。

また、化合物 (Ib) は、前記の工程とは逆に、ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物もしくはトシル化物をポリチオール類と反応させることによって得ることができる。

ポリアルキレングリコール類Aのチオール誘導体は市販のものを用いるか、Samuel Zalipskyらによってまとめられた方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)] で調製できる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法1に準じる。

製造法2-1

化合物 (Ib) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、 X^1 が-S-である化合物を製造法2に従って製造した後、製造法1-1～製造法1-9に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法3： X^1 が NR^3 である化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 が NR^3 (式中、 R^3 は前記と同義である) である化合物 (Ic) は、例えば製造法1と同様に、ポリオール類をポリアミン類に変換した化合物または市販のポリアミン類と、ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物もしくはトシル化物とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させることによって得

ることができる。

化合物 (Ic) は、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体をポリハライド類と反応させることによって得ることができる。

また、化合物 (Ic) はポリアルデヒド類1当量と、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体（該ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体は、ポリアルデヒド類の1つのホルミル基あたり1～30当量存在させる）とを、メタノール、エタノール、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、水、緩衝液等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、-20～100℃でシアノ水素化ホウ素ナトリウムや水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤（該還元剤は、ポリアルデヒド類の1つのホルミル基あたり1～30当量用いる）の存在下で反応させることによって得ることができる。

さらに、化合物 (Ic) は、ポリアミン類とポリアルキレングリコール類Aのアルデヒド誘導体を用いても製造することができる。

前記ポリアルデヒド類としては市販の化合物をそのまま用いるか、ポリアルコール類を酸化して用いるか、あるいはポリカルボン酸類を還元して用いればよい。また、ポリアルキレングリコール類Aのアルデヒド誘導体としては市販の化合物を利用できるし、また、ポリアルキレングリコール類Aの末端のアルコールを酸化して用いることもできる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法1に準じる。

製造法3-1

化合物 (Ic) のうち、R²がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Ic) を製造法3に従って合成した後、製造法1-1～製造法

1-9に記載された方法を組み合わせて製造することができる。

製造法4： X^1 が $R^4-NH-C(=O)-R^5$ または $R^6-C(=O)-NH-R^7$ である化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 が $R^4-NH-C(=O)-R^5$ (式中、 R^4 および R^5 はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (Ida) は、例えば γ -カルボキシグルタミン酸、クエン酸、1,2,3,4-ブタンテトラカルボン酸等から選ばれるポリカルボン酸化合物をペプチド合成法 [泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験 (1985年)、丸善] に従い、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中に溶解または懸濁し、次いでポリカルボン酸化合物中の1つのカルボキシル基あたり1~30当量のN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシフタルイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノール等のアルコール体と、ポリカルボン酸化合物中の1つのカルボキシル基あたり1~30当量のN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩等の縮合剤を加え、さらにポリカルボン酸化合物中の1つのカルボキシル基あたり1~30当量のポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体を加えて反応させることによって得ることができる。反応は無水条件下、 -20°C ~ 100°C で、1時間~10日間攪拌することによって行われる。

また、ポリカルボン酸分子中の1個以上のカルボキシをメチル、エチル、ベンジル、tert-ブチル等の適当な保護基で保護した後、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体を残りのカルボキシに前記の方法で導入し、続いてカルボキシの保護基を通常の脱保護法で除去することによって、 R^2 がカルボキシである3本鎖以上の分岐型ポリエチレングリコール誘導体を高純度を含む反応液を得ることもできる。この場合、カルボン酸の保護基の導入や該保護基の除去には通常のペプチドの合成法で用いられる方法 [泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験 (1985年)、丸善] を利用できる。ポリカルボン酸類中のカルボキシの配置は、立体配置を含めて何れでもよく、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体としては分子量分布が均一 (好ましくは、 M_w/M_n が1.1以下) であればいかなる平均分子量のものを用いてもよい。

また、化合物 (I) のうち、 X^1 が $R^6-C(=O)-NH-R^7$ (式中、 R^6 および R^7 はそれぞれ

前記と同義である)である化合物 (Idb) は、前記工程とは逆に、ポリアミン類とポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体の活性エステル、あるいはポリアルキレングリコール類Aの酸ハライド誘導体とを反応させる方法でも得ることができる。ポリアルキレングリコール類Aの酸ハライド誘導体はポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0~150°Cで、1~24時間加熱することによって得ることができる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

製造法 4-1

化合物 (Ida) および化合物 (Idb) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Ida) または化合物 (Idb) を製造法4に従って合成した後、製造法 1-1~製造法 1-9に記載された方法を組み合わせることで得ることができる。

製造法 5 : X^1 が $R^8-C(=O)-O$ または $O-C(=O)-R^9$ である化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 が $R^8-C(=O)-O$ (式中、 R^8 は前記と同義である) または $O-C(=O)-R^9$ (式中、 R^9 は前記と同義である) である化合物 (Ie) は、例えばポリアルキレングリコール類Aとポリカルボン酸類、あるいはポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体とポリオール類の組合わせを用いて、脱水縮合により得ることができる。脱水縮合の方法としては通常のエステル合成で用いられるような、酸または塩基触媒下に脱水する方法か、あるいはジメチルホルムアミド、ジメチル

スルホキシド、アセトニトリル、ピリジン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤で対応するアルコール体とカルボン酸を縮合する方法等を利用することができる。さらに、上記工程において酸ハロゲン化物と、対応するアルコール体を反応させることによっても目的物を合成できる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

製造法 5-1

化合物 (Ie) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Ie) を製造法 5 に従って合成した後、製造法 1-1~製造法 1-9 に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法 6 : X^1 が R^{6a} -O-C(=O)-NHまたは R^4 -NH-C(=O)-Oである化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 が R^{6a} -O-C(=O)-NH (式中、 R^{6a} は前記と同義である) である化合物 (Ifa) は、例えば以下のようにして製造することができる。

市販のポリアミン類、または前記製造法を組み合わせてポリオール類より調製したポリアミン類にポリアルキレングリコール類Aのカーボネート誘導体を3モル以上反応させて、化合物 (Ifa) を含む粗生成物が得られる。なお、ポリアルキレングリコール類Aのカーボネート誘導体は、Talia Mironらの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、4巻、568頁 (1993年)] に従って製造することができる。また、ポリアルキレングリコール類Aのカーボネート誘導体としては、N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルカーボネート、イミダゾリルカルボニルオキシ誘導体等を利用することができる。

化合物 (I) のうち、 X^1 が R^4 -NH-C(=O)-O (式中、 R^4 は前記と同義である) である

化合物 (Ifb) は、例えば以下のようにして製造することができる。

化合物 (Ifb) はポリオール類のカーボネート誘導体とポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体とを上記と同様に反応させることによって得ることができる。

他の製造法に準じて官能基の保護、脱保護を組み合わせることによって、化合物 (Ifa) または化合物 (Ifb) を選択的に生成させることもできる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

製造法 6-1

化合物 (If) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (If) を製造法 6 に従って合成した後、製造法 1-1 ~ 製造法 1-9 に記載された方法を組み合わせて調製することができる。

$R^1-M_n-X^1$ を L に結合して 1 本鎖化合物あるいは 2 本鎖化合物を取得し、同様の反応で前記と同一または異なる $R^1-M_n-X^1$ を L に結合して、3 本鎖以上の化合物を取得することもできる。例えば、製造法 1 ~ 製造法 6 に示した方法のうちいずれかの反応を利用して L 中の 1 個所あるいは 2 個所の官能基にポリアルキレングリコール類を結合させ、1 本鎖あるいは 2 本鎖化合物を得る。生成する 1 本鎖あるいは 2 本鎖化合物の割合は、反応に使用するポリアルキレングリコール類と、L 部分の構造を構築する原料の比を変えることで調節することができ、1 本鎖あるいは 2 本鎖化合物を主成分にすることも可能である。得られた 1 本鎖あるいは 2 本鎖化合物はそのままの純度で、あるいは製造法 1 に示した方法に準じてポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度に、あるいは高純度に精製して次のステップに使用することができる。

このようにして得られた 1 本鎖あるいは 2 本鎖化合物と、前記と同一または異なる

ポリアルキレングリコール類を製造法1～製造法6に示したいずれかの方法に準じて結合して、3本鎖以上の化合物が調製できる。なお、3本鎖以上のポリアルキレングリコール類は1本鎖あるいは2本鎖化合物を取得した反応と同様の反応に付すこともできるが、異なる反応に付し異なる結合様式を有するように調製してもよい。例えば、水酸基、アミノ、カルボキシ等の複数の官能基を有する化合物をL部分の構造を構築する原料に使用する場合、製造法1に示した方法で X^1 がOである1本鎖あるいは2本鎖化合物をまず取得し、次いで製造法4に示した方法で3本鎖以上のポリアルキレングリコール類を X^1 が $R^4-NH-C(=O)-R^5$ となるように反応させることができる。以上のように製造法1～6の組合わせで複数のポリアルキレングリコール類が同一または異なる結合様式でLに結合した3本鎖以上の化合物を得ることができる。さらに、使用するポリアルキレングリコール類は各反応の段階で分子量が異なってもよく、各々のポリアルキレングリコール類をLに結合させる反応で異なる平均分子量のポリアルキレングリコール類を使用することで容易に目的物が得られる。

また、Lにポリアルキレングリコール類を導入する反応において、L中の1個所以上の官能基（例えば製造法1の場合、1個所以上の水酸基）を残し、他の官能基を適当な保護基で保護してから、ポリアルキレングリコール類と反応、結合させ、その後、保護基を除去することも可能である。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類は、上記製造法で具体的に示された化合物以外であっても、上記製造法に準じて得ることができる。

なお、先にも述べたとおり、製造法1～6の各工程において、原料に用いるポリアルキレングリコール類は市販のものをを用いることもできるが、Samuel Zalipskyによってまとめられた各種の方法[バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)]等によって容易に製造することも可能である。

得られた分岐型ポリアルキレングリコール類はシリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、再結晶、抽出等の方法によって、ポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度の分岐型ポリアルキレングリコール

類に精製することができる。

得られた分岐型ポリアルキレングリコール類は前記生理活性ポリペプチドのアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基に直接、あるいはスペーサーを介して結合させることができる。

スペーサーとしてはアミノ酸やペプチドが好ましいが、ポリアルキレングリコール類を結合することができればそれ以外であってもよい。アミノ酸としてはリジン、システイン等の天然アミノ酸等を用いることができ、オルニチン、ジアミノプロピオン酸、ホモシステイン等を用いることもできる。より好ましくは、システインがあげられる。ペプチドとしては、アミノ酸残基2~10からなるものが好ましい。アミノ酸、ペプチド以外のスペーサーとしては、グリセロール、エチレングリコール、糖等があげられる。ここで、糖としては、グルコース、ガラクトース、ソルボース、ガラクトサミン、ラクトース等の単糖類や二糖類等があげられる。

これらのスペーサーは、生理活性ポリペプチド分子中のリジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン等の残基の側鎖とアミド結合、チオエーテル結合、エステル結合等を介して結合するか、該ポリペプチドのC末端カルボキシル基とアミド結合やエステル結合するかペプチドのN末端アミノ基とアミド結合する。これらの結合は、通常のペプチド合成法【泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験（1985年）、丸善】や遺伝子組換え法を用いて行うことができる。

この場合、生理活性ポリペプチドを合成すると同時にC末端カルボキシル基にスペーサーとなるアミノ酸、ペプチド等を導入することが望ましいが、生理活性ポリペプチドを合成した後にスペーサーを結合してもよい。また、該ポリペプチドのC末端カルボキシル基等を化学合成的に活性化してスペーサーに結合することもできる。また、ポリアルキレングリコール類を予め結合したスペーサーを前記の方法で生理活性ポリペプチドに結合することもできる。

本発明で用いられる生理活性ポリペプチドとしては、ポリペプチド、抗体、およびそれらの誘導体等があげられる。ポリペプチドとしては、例えば、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase)、

ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine deaminase)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、プラスミノゲン (Plasminogen) 等の酵素、インターロイキン1~18 (Interleukin-1~18)、インターフェロン- α (Interferon- α)、インターフェロン- β (Interferon- β)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、インターフェロン- ω (Interferon- ω)、インターフェロン- τ (Interferon- τ)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、エリスロポエチン (Erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、繊維芽細胞増殖因子1~18 (Fibroblast Growth Factor-1~18)、ミッドカイン (Midkine)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、オステオジェニックプロテイン1 (Osteogenic Protein 1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Factor)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor) 等のサイトカイン、グルカゴン (Glucagon)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon Like Peptide) 等のホルモン、クローソ蛋白質 (Klotho)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、レプチン (Leptin)、カルシトニン (Calcitonine)、アミリン (Amylin)、インスリン様成長因子1 (Insulin Like Growth Factor 1)、エンドスタチン (Endostatin) 等があげられる。

本発明で使用される抗体は、公知の手段 [アンティボディーズ ア ラボラトリー マニュアル、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) (1988年)] を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

本発明で使用される抗体として、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましい。

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片等があげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体等があげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す）および軽鎖可変領域（以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、定常領域はC領域としてCHとも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CLとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であればいかなるものも用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のH鎖、L鎖のV領域のCDRのアミノ酸配列をヒトの抗体のH鎖、L鎖のV領域の適切な位置に移植した抗体を意味する。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片、相補性決定領域を含むペプチド等があげられる。

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パバインで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

一本鎖抗体（以下、scFvとも称す）は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLとしては、本発明のモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のいずれをも用いることができる。

ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvとも称す）は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法〔プロテイン エンジニアリング(Protein Engineering)、

7巻、697頁（1994年）]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれるVHあるいはVLとしてはモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のいずれをも用いることができる。

生理活性ポリペプチドの誘導体としては、アミノ酸置換体、アミノ酸欠失体、糖鎖付加体、糖鎖欠失体、部分ペプチド等があげられる。

上述した生理活性ポリペプチドまたはその誘導体の中でも、好ましくはインターフェロン- β 、インターフェロン- α 、インターフェロン- γ 等のインターフェロン類、顆粒球コロニー刺激因子、スーパーオキシドディスムターゼ等があげられる。

これらの生理活性ポリペプチドは動物臓器や組織から抽出する方法でも得られるが、通常のペプチド合成法、あるいは遺伝子組換え法で製造することによっても得ることができる。さらに、市販のポリペプチドも用いることができる。

また、反応に使用する該ポリペプチドとしては粗精製物を用いることができ、またゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、抽出等の精製法により化学修飾に適した純度に精製したものをを用いることもできる。

該ポリペプチドはリン酸緩衝液、ほう酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の緩衝液もしくは水、またはN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサン、テトラヒドロフラン等の適当な有機溶媒中、あるいはこれらの有機溶媒と水溶液との混合溶媒中で製造され、化学修飾反応に用いられる。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類は、ポリペプチド、さらに詳細にはそして好ましくは、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、エリスロポエチン、インターフェロン、インターロイキン等の遊離システイン残基を有するあらゆる天然型または遺伝子組換え型のポリペプチドの共有結合による部位特異的修飾にも使用することができる。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドの製造は、分岐型ポリアルキレングリコール類を生理活性ポリペプチド1モルあたり1~1000モル程度、好ましくは1~50モル程度用いて反応させることによって行われる。分岐型ポリアルキレングリコール類の生理活性ポリペプチドへの修飾の度

合いは生理活性ポリペプチドに対する分岐型ポリアルキレングリコール類のモル比、反応温度、pH、反応時間等を調節することによって、任意に選択することができる。また、反応に使用する溶媒は反応を妨害しないものであればいずれでもよく、例えばりん酸緩衝液、ほう酸緩衝液、トリスー塩酸緩衝液、炭酸水素ナトリウム水溶液、酢酸ナトリウム緩衝液、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、メタノール、アセトニトリル、ジオキサン等、あらゆるものから選択することができる。反応の温度、pHおよび時間は生理活性ポリペプチドの活性が損なわれない条件であればいずれでもよく、例えば0～50℃、10分～100時間、pH4～10が好ましい。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドの精製は常法に従って、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、限外濾過等により行うことができる。合成または精製された生理活性ポリペプチドまたは分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された該生理活性ポリペプチドが該ポリペプチドの構造を有するものであることの確認は、質量分析、核磁気共鳴 (NMR) およびアミノ酸分析計によるアミノ酸組成分析により、また気相プロテインシーケンサーによりエドマン分解して得られたフェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸を逆相 HPLC で分析することによるアミノ酸配列分析等により行うことができる。

本発明の化学修飾ポリペプチドは人間または動物用の薬剤組成物の形態で投与することができ、該組成物は通常の薬剤製造法によって製造することができる。投与方法としては経口、静脈内、皮下、筋肉下、腹腔内、経皮投与または他の許容される方法等が可能であり、投与に適する組成物を用いることができる。これらの剤形には通常用いられる等張化剤、緩衝剤、賦形剤、pH調整剤、安定化剤、防腐剤、溶解剤、湿潤剤、乳化剤、滑沢剤、甘味剤、着色剤、酸化防止剤等の慣用の添加剤を添加して用いることができる。

化合物 (I) の具体例を第 1 表および第 2 表に示す。

なお、第 1 表における化合物の構造について補足する。

1) 実施例 1 で得られる化合物 5TRC(3UA) において、 $(X^2-X^3-R^2)$ に該当するカルボキシル基は $-NHCH_2-$ のメチレン基に結合している。 $[CH_3-(OCH_2CH_2)_n-X^1]$ に該当

する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ -はメチレンオキシ基 ($-\text{CH}_2\text{O}-$) に結合している。

2) 実施例2で得られる化合物5SKA(3UA)において、 $(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)$ に該当するカルボキシル基はシクロヘキセン環の1位に結合している。 $[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]$ に該当する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ -はシクロヘキセン環の3位、4位、5位の酸素原子に結合している。

3) 実施例3で得られる化合物5QNA(4UA)において、 $(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)$ に該当するカルボキシル基はシクロヘキサン環の1位に結合し、カルボキシル基は紙面の上に突き出す立体構造である。1位に結合する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-\text{O}$ -は紙面の下に突き出す立体構造である。 $[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]$ に該当する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ -はシクロヘキサン環の1位、3位、4位、5位の酸素原子に結合している。

4) 実施例4で得られる化合物5PET(3UA)において、 $(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)$ に該当する $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ はメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) に結合する。 $[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]$ に該当する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ -は、メチレンオキシ基 ($-\text{CH}_2\text{O}-$) に結合する。

5) 実施例5で得られる化合物5PET(3UM)において、 $(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)$ に該当する3-マレイミドプロピルアミノカルボニルオキシ基はメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) に結合する。

$[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]$ に該当する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ -は、メチレンオキシ基 ($-\text{CH}_2\text{O}-$) に結合する。

6) 実施例6で得られる化合物5PET(3UU)において、 $(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)$ に該当するマレイミドオキシカルボニルオキシ基はメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) に結合する。

$[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]$ に該当する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ -は、メチレンオキシ基 ($-\text{CH}_2\text{O}-$) に結合する。

7) 実施例7で得られる化合物5PET(3URa)において、 $(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)$ に該当する $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ はメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) に結合する。 $[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]$ に該当する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ -は、メチレンオキシ基 ($-\text{CH}_2\text{O}-$) に結合する。

8) 実施例8で得られる化合物5SUG(4UA)において、 $(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)$ に該当するカルボキシル基 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})$ は1位のオキシメチレン基 ($-\text{OCH}_2-$) に結合する。

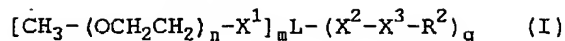
$[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]$ に該当する $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$ は、2 位、3 位、4 位の酸素原子および 5 位のメチレンオキシ基に結合する。

第1表

$$[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]_m \text{L}-(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)_q \quad (I)$$

実施番号 略号	X^1	m	L	q	$\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2$
1 5TRC(3UA)		3		1	
2 5SKA(3UA)		3		1	
3 5QNA(4UA)		4		1	
4 5PET(3UA)		3		1	
5 5PET(3UM)		3		1	
6 5PET(3UU)		3		1	
7 5PET(3URa)		3		1	
8 5SUG(4UA)		4		1	

第2 表



実施例番号 略号	化合物(I)の構造
3 5QNA (3UA)	
8 5SUG (3UA)	

$\text{R}^{\text{X}1}$ 、 $\text{R}^{\text{X}2}$ 、 $\text{R}^{\text{X}3}$ 、 $\text{R}^{\text{X}4}$ のうち、1箇所は水素原子であり、残りの3箇所は $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ である。

$\text{R}^{\text{Y}1}$ 、 $\text{R}^{\text{Y}2}$ 、 $\text{R}^{\text{Y}3}$ 、 $\text{R}^{\text{Y}4}$ のうち、1箇所は水素原子であり、残りの3箇所は $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{OCH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ である。

図面の簡単な説明

図1 化学修飾ヒト組換え型インターフェロン- β をマウスに静脈内注射したときの血中半減期延長効果を示す。

- ：未修飾rhIFN- β の血中濃度推移を表す。
- ▲—：5TRC(3UA)-rhIFN- β の血中濃度推移を表す。
- ：PEG₂Lys-rhIFN- β の血中濃度推移を表す。

図2 化学修飾ヒト組換え型顆粒球コロニー刺激因子類をラットに静脈内注射し

たときの血中半減期延長効果を示す。

- ：未修飾rhG-CSF誘導体の血中濃度推移を表す。
- ：未修飾rhG-CSFの血中濃度推移を表す。
- ▲—：5SKA(3UA)-rhG-CSF誘導体の血中濃度推移を表す。
- △—：5SKA(3UA)-rhG-CSFの血中濃度推移を表す。
- ：PEG₂Lys-rhG-CSF誘導体の血中濃度推移を表す。
- ：PEG₂Lys-rhG-CSFの血中濃度推移を表す。

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例は本発明を具体的に説明するものであり、決して本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきでない。実施例中の略号は特に断らない限り、それぞれ以下のことを意味する。なお、本明細書において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会 (IUPAC-IUB

Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告〔ヨーロッパジャーナル オブ バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.) 138巻, 9頁, 1984年〕に従った。HPLC: 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography)

RI: 示差屈折 (Refractive Index)

NMR: 核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance)

ELISA: 酵素免疫測定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

SDS-PAGE: ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

PEG: ポリエチレングリコール (poly(ethylene glycol))

mPEG: モノメトキシポリエチレングリコール (monomethoxy poly(ethylene glycol))

IFN: インターフェロン (interferon)

hIFN: ヒトインターフェロン (human interferon)

rhIFN: 組換え型ヒトインターフェロン (recombinant human interferon)

G-CSF: 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor)

rhG-CSF: 組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (recombinant human

granulocyte-colony stimulating factor)

SOD: スーパーオキサイドディスムターゼ (superoxide dismutase)

bSOD: ウシスーパーオキサイドディスムターゼ (bovine superoxide dismutase)

hSOD: ヒトスーパーオキサイドディスムターゼ (human superoxide dismutase)

DSC: N, N'-ジスクシンイミジルカーボネート (N, N'-disuccinimidyl carbonate)

TEA: トリエチルアミン (triethylamine)

DMF: N, N-ジメチルホルムアミド (N, N-dimethylformamide)

DMSO: ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide)

NHS: N-ヒドロキシスクシンイミド (N-hydroxysuccinimide)

Ts: p-トルエンシルホニル (p-toluenesulfonyl)

TsCl: 塩化p-トルエンシルホニル (p-toluenesulfonylchloride)

DMAP: ジメチルアミノピリジン (dimethylaminopyridine)

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフル
オロリン酸 (benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (N-hydroxybenzotriazole)

DCC: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (N, N'-dicyclohexylcarbodiimide)

LAH: 水素化リチウムアルミニウム (lithium aluminium hydride)

NMM: N-メチルモルホリン (N-methylmorpholine)

TFA: トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid)

CDI: N, N'-カルボニルジイミダゾール (N, N'-carbonyldiimidazole)

実施例1 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコールトリシン誘導体の合成

略号: 5TRC(3UA)

0.5mg (2.8 μ mol) のトリシン (Tricine) (N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]glycine、ナカライテスク社) と50mg (10.0 μ mol) のPEG-NCO (Shearwater polymers, Inc製、平均分子量5,000、構造: $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-N-C=O}$) を、アルゴン気流下0.5mlのDMFに溶解し、1.4 μ l (10.0 μ mol) のTEAを加え、さらに約1mgの塩化銅を加え、室温で5時間攪拌した。さらに、10mgのPEG-NCOおよび1 μ lのTEAを加えて2時間攪

拌した。その後、さらに15mgのPEG-NCOを追加し、室温で一昼夜攪拌した。

0.1mol/L塩酸を50ml加えた後、50mlのクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を除去した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解し、ジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を濾取し、目的の化合物を含む粗生成物15mgを取得した（収率20%）。次に、DEAE Sepharose F.F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製した。1mol/L塩化ナトリウム水溶液で溶出し、溶出液を酸性条件下、クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。その後、溶媒を減圧下除去し、目的物を6.0mg取得した（収率8.0%）。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW_{XL}カラム（7.8×300mm）（東ソー）を用い、以下の条件で分析した。

移動相：150mmol/L塩化ナトリウム、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）

流量：0.7ml/分

検出：RI

保持時間：11.5分

<¹H-NMR分析（300MHz、CDCl₃中）>

δ（ppm）：3.38（s, 9H）、3.64（s, 12nH）、4.10（s, 6H）、5.43（br, 3H）

実施例2 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シキミ酸誘導体の合成

略号：5SKA(3UA)

3.2mgのシキミ酸（Shikimic acid）をDMF 250μlに溶解した後、15μlのトリエチルアミン、触媒量の塩化銅を添加した。さらに300mgのPEG-NCO（Shearwater polymers, Inc.製、平均分子量5,000、構造： $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-N-C=O}$ ）を添加し、室温で1時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗目的物270mg（89%）を得た。

DEAE Sepharose F. F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）を用いて、実施例1と同様にして精製した。目的画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧除去して目的化合物18mg（収率6%）を得た。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：11.7分

<¹H-NMR分析 (300MHz、CDCl₃中) >

δ (ppm) : 3.38 (s, 9H) 、 3.64 (s, 12nH) 、 5.1~6.6 (m, 4H)

実施例3 5kDa 3~4本鎖分岐型ポリエチレングリコールーキナ酸誘導体の合成

略号：5QNA(3UA)、5QNA(4UA)

3mgのキナ酸（(1R, 3R, 4R, 5R) - (−) -Quinic acid）をDMF 250 μlに溶解した後、17 μlのトリエチルアミン、触媒量の塩化銅を添加した。さらに344mgのPEG-NCO（Shearwater polymers Inc製）を添加し、室温で1時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗目的物306mg（88%）を得た。DEAE Sepharose F.F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）を用いて、実施例1と同様にして精製した。目的画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧除去して以下の化合物を得た。

第3表

化合物略号	PEG 結合数	取得量	収率	ゲル濾過 HPLC での保持時間*
5QNA(3UA)	3	24mg	10.2%	11.7 分
5QNA(4UA)	4	17mg	5.4%	11.1 分

* : TSKgelG2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

<¹H-NMR分析 (300MHz、CDCl₃中) >

化合物5QNA(3UA): δ (ppm) : 3.38 (s, 9H) 、 3.64 (s, 12nH) 、 4.8~5.7 (m, 3H)

化合物5QNA(4UA): δ (ppm) : 3.38 (s, 12H) 、 3.64 (s, 16nH) 、 4.8~5.7 (m, 3H)

実施例4 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコールーペンタエリスリトール誘導

体の合成

略号：5PET(3UA)

ペンタエリスリトール (pentaerythritol) 136mgとDMAP 122mgをアルゴン気流中DMF 5mlに溶解し、CDI 778mgを加え、0°C～室温で一昼夜攪拌した。mPEG-NH₂ (平均分子量5,000、日本油脂(株)社製、構造： $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) 5.0gをDMF 10mlに溶解し、上記の反応混合物1.25mlを加え、室温で2時間攪拌した。0.1mol/Lほう酸緩衝液 (pH10) 100mlにγ-アミノ酪酸 (γ-aminobutylic acid) 2.6gを溶解した溶液を氷冷し、ここに反応液を注いだ。0°Cで2時間、室温で4時間攪拌した後、塩酸でpHを酸性に調整し、クロロホルムで抽出し、溶媒を減圧下除去し、残渣を4.2g得た (84.6%)。残渣3.8gを1000mlのDEAE Sepharose F.F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で実施例1と同様にして精製し、目的物を254mg得た (収率6.7%)。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：11.4分

<¹H-NMR分析 (300MHz、CDCl₃中) >

δ (ppm) : 5.44 (brt, J=5.0 Hz, 3H)、5.25 (br, 1H)、4.09 (brs, 8H)、3.65 (s, 12nH)、3.29 (s, 9H)、3.26 (m, 8H)、2.37 (t, J=6.8 Hz, 2H)、1.80 (brm, 2H)、1.77 (m, 6H)

実施例5 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール-ペンタエリスリトール誘導体の合成

略号：5PET(3UM)

ペンタエリスリトール136mgとDMAP 122mgをDMF 5mlに溶解し、CDI 778mgを加えてアルゴン気流中0°C～室温で一昼夜攪拌した。mPEG-NH₂ (平均分子量5,000、日本油脂(株)社製) 1.0gをDMF 2mlに溶解し、上記の反応混合物0.25mlを加え、室温で2時間攪拌した。続いて187μlのプロピレンジアミンを加え、室温で2時間攪拌後、ジエチルエーテルを加えた。白色沈殿を回収し、減圧乾燥して残渣975mgを得た (収率97.5%)。残渣を100mlのSP Sepharose F.F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社)

で精製した。0.2~0.4mmol/LのNaClで溶出した画分をクロロホルムで抽出し、白色粉末110mgを得た（収率11.3％）。

次に、この白色粉末100mgを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液0.5mlに溶解し、0℃でエトキシカルボニルマレイミド2.3mgを加え、さらに0℃で10分間攪拌した。

水1.5mlを加え、室温で15分間攪拌後、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を減圧濃縮後、ジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を減圧乾燥し、目的物35mgを得た（収率35％）。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：11.3分

<¹H-NMR分析（300MHz、CDCl₃中）>

δ（ppm）： 6.73（s, 2H）、5.33（br, 3H）、4.08（brs, 8H）、3.64（s, 12nH）、3.36（s, 9H）、3.25（m, 6H）、3.11（m, 2H）、1.77（m, 8H）

実施例6 3本鎖分岐型ポリエチレングリコールーペンタエリスリトール誘導体の合成

略号：5PET(3UU)

ペンタエリスリトール136mgとDMAP 122mgをDMF 5mlに溶解し、CDI 681mgを加えてアルゴン気流中0℃~室温で一昼夜攪拌した。mPEG-NH₂（平均分子量5,000、日本油脂(株)社製）1.0gをDMF 2mlに溶解し、前述した反応混合物286μlを加え、室温で2時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を回収して減圧乾燥し、残渣を1g得た（収率100％）。

残渣を、TSKgelODS-120Tカラム（30mm×250mm、東ソー）を用いて精製した。溶離液には0.1％TFAを含む0~90％アセトニトリル水溶液を用いた。3本鎖PEGを含む画分を減圧濃縮し、クロロホルムで抽出し、溶媒を減圧下除去し、残渣を165mg得た（収率16.5％）。

次に、この白色粉末80mgを塩化メチレン1mlに溶解し、DSC 4.1mg、DMAP 2.1mgを加え、アルゴン気流中室温で6時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下

し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、目的物を63mg得た（収率78.8％）。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：10.7分

<¹H-NMR分析（300MHz、CDCl₃中）>

δ（ppm）：5.49（br, 3H）、4.11（brs, 8H）、3.64（s, 12nH）、3.38（s, 9H）、3.25（m, 6H）、2.87（s, 4H）、1.78（m, 8H）

実施例7 3本鎖分岐型ポリエチレングリコールーペンタエリスリトール誘導体の合成

略号：5PET(3URa)

ペンタエリスリトール136mgとDMAP 122mgをDMF 5mlに溶解し、CDI 681mgを加えてアルゴン気流中0℃～室温で一昼夜攪拌した。mPEG-NH₂（平均分子量5,000、日本油脂(株)社製）1.0gをDMF 2mlに溶解し、前述した反応混合物286μlを加え、室温で2時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を回収して減圧乾燥し、残渣を950mg得た（収率95％）。続いて残渣をTSKgelODS-120Tカラム（30mm×250mm、東ソー）を用いて精製した。溶離液には0.1％TFAを含む0～90％アセトニトリル水溶液を用いた。3本鎖PEGを含む画分を減圧濃縮し、クロロホルムで抽出し、溶媒を減圧下除去し、残渣を300mg得た（収率31.6％）。

次に、得られた残渣（白色粉末）300mgを塩化メチレン1mlに溶解し、DSC 15.4mg、DMAP 7.3mgを加え、アルゴン気流中室温で6時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥した。塩化メチレン1mlを加えて溶解し、4-アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（4-aminobutyraldehyde diethylacetal）3.5μlを加え、室温で2時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、残渣を250mg得た（収率83.3％）。

残渣100mgを10％TFAを含む塩化メチレンに溶解し、0℃で1時間静置後、ジエチルエーテルに滴下して白色沈殿を減圧乾燥し、40mgの目的物を得た（収率40.0％）。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：10.6分

実施例8 3～4本鎖分岐型ポリエチレングリコール-糖誘導体の合成

略号：5SUG(3UA)、5SUG(4UA)

5.18 gの α -D-グルコースペンタアセテートをDMF 80 mlに溶解し、2.37 gのヒドラジンアセテートを添加し、室温で1.5時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで抽出後、酢酸エチル層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶液を減圧濃縮して、 α -D-グルコピラノース-2, 3, 4, 6-テトラアセテート (α -D-Glucopyranose-2, 3, 4, 6-tetraacetate) を4.0 g得た (収率87%)。

<¹H-NMR分析 (300 MHz、CDCl₃中)>

δ (ppm): 2.02 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.14 (m, 1H), 4.27 (m, 2H), 4.91 (m, 1H), 5.09 (t, J=9.7 Hz, 1H), 5.47 (d, J=3.7 Hz, 1H), 5.55 (t, J=9.8 Hz, 1H)

850 mgの上記化合物を塩化メチレン15 mlに溶解し、0°Cにて4.8 mlのトリクロロアセトニトリル、365 mlのDBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene)を添加し、0°Cで1時間、室温で15分間攪拌した。溶液を減圧下濃縮した後、シリカゲルカラムで精製し、 α -D-グルコピラノース-2, 3, 4, 6-テトラアセテート1-(2, 2, 2-トリクロロエタニイミデート) (α -D-glucopyranose-2, 3, 4, 6-tetraacetate-1-(2, 2, 2-Trichloroethanimidate)) を635 mg得た (収率53%)。

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300 MHz)>

δ (ppm): 2.02 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 4.13 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 5.19 (t, J=9.8 Hz, 1H), 5.57 (t, J=9.9 Hz, 1H), 6.56 (d, J=3.7 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H)

693 mgの上記化合物と109 μ lのグリコール酸メチルを脱水塩化メチレンに溶解し、モレキュラーシーブス4Aを1.62 g添加し、アルゴン雰囲気下、室温で4時間攪拌した。反応液を0～5°Cに冷却し、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリルと脱水

塩化メチレンの混合溶液(2:1)163 μ lを添加し、0~5°Cで19時間攪拌した。77 μ lのトリエチルアミンを添加し、セライトで濾過した。溶液を減圧下濃縮した後、シリカゲルカラムで精製し、[(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)オキシ]酢酸メチルエステル[(2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl) oxy] acetic acid methyl esterを162 mg得た(収率27%)。

< $^1\text{H-NMR}$ 分析 (CDCl_3 , 300 MHz)>

δ (ppm): 2.01 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 3.70 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.14 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.29 (s, 2H), 4.67 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 5.09 (t, $J=10.8$ Hz, 1H), 5.25 (t, $J=9.5$ Hz, 1H)

162 mgの上記化合物をメタノール1 mlに溶解し、アンバーリストを添加した。ナトリウムメトキシドのメタノール溶液(28%)9.4 μ lを添加し、室温で3時間攪拌した。セライトで濾過し、濾液を減圧下濃縮して[(β -D-グルコピラノシル)オキシ]酢酸メチルエステル[(β -D-glucopyranosyl) oxy] acetic acid methyl esterを80 mg得た(収率82%)。

< $^1\text{H-NMR}$ 分析 (D_2O , 300 MHz)>

δ (ppm): 3.39 (s, 2H), 3.40 (m, 2H), 3.69 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.86 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.44 (m, 1H)

<質量分析 (FAB-MS)>

実測値: $[\text{M}+\text{H}] = 253$

理論値: $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_8 = 252$

2 mgの上記化合物をDMF 100 μ lに溶解し、7 μ lのトリエチルアミン、触媒量のCuClを添加した。160 mgのmPEG-NCOを添加し、室温で2時間攪拌した。80 mgのmPEG-NCOを添加しさらに3時間攪拌した。溶液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧乾燥した。得られた白色固体200 mgを2 mlの1 mol/L 炭酸カリウム水溶液に溶解し、室温で4時間攪拌した。クロロホルムおよび0.1 mol/L塩酸を添加し、クロロホルムで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥

させた後、溶媒を減圧下除去し、残渣を減圧乾燥し、白色固体195 mgを得た。20mlのDEAE Sepharose F.F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、下記に示す化合物を得た。

第4表

化合物略号	PEG 結合数	取得量	収率	ゲル濾過 HPLC での保持時間*
5SUG(3UA)	3	6mg	5.0%	10.8 分
5SUG(4UA)	4	12mg	7.6%	10.4 分

* : TSKgelG2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

<¹H-NMR分析 (300MHz、CDCl₃中) >

化合物5SUG(3UA) : δ (ppm) : 3.38 (s, 9H), 3.64 (t, 12nH), 4.1~5.6 (m, 7H)

化合物5SUG(4UA) : δ (ppm) : 3.38 (s, 12H), 3.64 (t, 16nH), 4.1~5.6 (m, 7H)

実施例9 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の調製

略号 : 5TRC(3UA)-rhIFN- β

実施例1の化合物 (5TRC(3UA)) 5mg (0.33 μ mol) に塩化メチレンで調製した1.5mg/mlのNHS溶液50 μ l (0.66 μ mol)、1.4mg/mlのDCC溶液100 μ l (0.66 μ mol)を加え、アルゴン気流中氷冷下30分間、室温で2時間攪拌した。ジエチルエーテルを加えて生成した沈殿を減圧下乾燥してNHSエステルを3.5mg (収率70%) 得た。

次に、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した参考例4で得られるrhIFN- β 溶液150 μ l (0.9mg/ml) へ、上記で活性化した修飾試薬 (NHSエステル) を33.4mg (蛋白質1モルに対して34モル) 加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。反応液をゲル濾過カラムSephadex G-25

(Amersham-Pharmacia Biotech社) に付し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6.0) に緩衝液交換し、CM Sepharose F.F.カラム0.5ml

(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製した。反応液をチャージ後、同緩衝液5mlでカラムを洗浄した後、塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出した。目的物を含む画分を回収し、0.091mg/mlの目的物を0.40ml得た(収率27.0%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、以下の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

ゲル：PAGEL SPG 520L (アトー社製)

染色：FAST STAINTM

分子量マーカー：Low Molecular Weight Standard (バイオラッド社製)

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、以下の条件で分析した。

移動相：150mmol/L塩化ナトリウム、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)

流量：0.5ml/分

検出：UV280nm

分離カラム：TSKgelG4000SW_{XL} (7.8×300mm×2本) (東ソー社製)

保持時間：42.0分 (1分子結合体)

44.1分 (2分子結合体)

実施例10 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロナーβの調製

略号：SSKA(3UA)-rhIFN-β

実施例2の化合物 (SSKA(3UA)) 16mg (1.1μmol) を100μlの塩化メチレンに溶解し、272μgのDCCと152μgのNHSを加え、氷冷下1時間、室温で1時間攪拌した。ジエチルエーテルに滴下して生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例2の化合物のNHSエステルを14.5mg得た(収率91%)。

次に、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した参考例4で得られるrhIFN-β溶液100μl (1.2mg/ml) へ、上記で得られたNHSエステルを8.6mg (蛋白質1モルに対して100モル) 加え、4℃で一昼夜静置して

反応させた。反応液をゲル濾過カラムSephadex G-25 (Amersham-Pharmacia Biotech社) に付し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6.0) に緩衝液交換し、CM Sepharose F.F.カラム0.6ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。反応液をチャージ後、同緩衝液3mlでカラムを洗浄した後、塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出した。目的物を含む画分を回収し、47 μ g/mlの目的物を80 μ l得た (収率3.3%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：41.7分 (1分子結合体)

実施例11 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の調製

略号：5PET(3UU)-rhIFN- β

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.8)で調製した参考例4で得られるrhIFN- β 溶液0.5ml(1.2mg/ml)へ、実施例6で得られた5PET(3UU)を4.5mg(蛋白質1モルに対して10モル)加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液0.5mlをSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) に付し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6) に緩衝液交換した。これをCM-SepharoseF.F.カラム0.8ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) に通塔し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH6)4.0mlで洗浄後、0.1~0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.67mg/mlの目的物を含む溶液0.36mlを得た (収率40%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：41.1分（1分子結合体）

38.2分（2分子結合体）

実施例12 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の調製

略号：5PET(3UA)-rhIFN- β

実施例4の化合物（5PET(3UA)）254mg(0.02mmol)を、2.0mlの塩化メチレンに溶解し、NHS 5.9mg(0.05mmol)、DCC 10.5mg(0.05mmol)を加え、アルゴン気流中0℃で1時間、室温で2時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥して実施例4の化合物のNHSエステルを132.8mg得た(収率52.3%)。

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.8)で調製した参考例4で得られるrhIFN- β 溶液1.0ml(1.16mg/ml)へ、前記の5PET(3UA)のNHSエステルを13mg(蛋白質1モルに対して15モル)加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH6）に緩衝液交換した。これをCM-SepharoseF.F.カラム1.4ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH6)7.0mlで洗浄後、0.1~0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.14mg/mlの目的物を含む溶液1.0mlを得た（収率12%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：43.8分（1分子結合体）

41.2分（2分子結合体）

実施例13 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の調製

略号: 5PET(3UA)- 17 Ser, rhIFN- β

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で調製した 17 Ser rhIFN- β (Chiron社製)の溶液0.05ml(2.1mg/ml)へ、実施例12と同様にして得られた5PET(3UA)のNHSエステル1.6mg(蛋白質1モルに対して20モル)を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)に付し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH6)に緩衝液交換した。ゲル濾過で得られた画分をCM-Sephadex F.F.カラム0.5ml

(Amersham-Pharmacia Biotech社)に通塔し、エチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH6)8mlで洗浄後、0.2~1.0mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、27.8 μ g/mlの目的物を含む溶液0.30mlを得た(収率7.9%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例14 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- α の調製

略号: 5PET(3UA)-rhIFN- α

等張りん酸緩衝液(pH7.5)で調製した1.0mg/mlのrhIFN- α 溶液[免疫生物研(IBM)]0.1mlへ、実施例12と同様にして得られた5PET(3UA)のNHSエステル1.6mg(蛋白質1モルに対して20モル)を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)に付し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に緩衝液交換した。これをSP-Sephadex F.F.カラム0.7ml

(Amersham-Pharmacia Biotech社)に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で洗浄後、0.1~0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を

統合後、濃縮し、0.53mg/mlの目的物を含む溶液65 μ lを得た（収率34%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：42.6分（1分子結合体）

40.3分（2分子結合体）

実施例15 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：5SKA(3UA)-rhG-CSF誘導体

実施例2の化合物（5SKA(3UA)）16mg（1.1 μ mol）を100 μ lの塩化メチレンに溶解し、272 μ gのDCCと152 μ gのNHSを加え、氷冷下1時間、室温で1時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下して生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例2の化合物のNHSエステルを14.5mg得た（収率91%）。

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で3.7mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体50 μ lに上記活性化した化合物（NHSエステル）3.6mg（蛋白質1モル当たり25モル）を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、0.7mlのSP Sepharose F.F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製した。目的画分を濃縮し、0.4mg/mlの目的物を含む溶液165 μ lを取得した（収率36%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：42.3分（1分子結合体）

40.2分 (2分子結合体)

実施例16 5kDa 4本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子を含む溶液の調製

略号：5QNA(4UA)-rhG-CSF誘導体

実施例3の化合物 (5QNA(4UA)) 69mg (3.5 μ mol) を500 μ lの塩化メチレンに溶解し、1.8mgのDSCと0.56mgのDMAPを加え、室温で6時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例3の化合物のNHSエステルを44mg得た (収率63%)。

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH8) で3.8mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体50 μ lに上記の活性化した化合物 (NHSエステル) 5.1mg (蛋白質1モル当たり25モル) を加え、4°Cで一昼夜反応させた。これ以上の精製操作を行わずに、得られた生成物を電気泳動、ゲル濾過HPLC分析により確認した。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：40.8分 (1分子結合体)

実施例17 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の調製

略号：5SKA(3UA)-rhG-CSF

実施例2の化合物 (5SKA(3UA)) 16mg (1.1 μ mol) を100 μ lの塩化メチレンに溶解し、272 μ gのDCCと152 μ gのNHSを加え、氷冷下1時間、室温で1時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例2の化合物のNHSエステルを14.5mg得た (収率91%)。

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で4.4mg/mlに調製した参考例6で得られたrhG-CSF

140 μ lに上記の活性化した化合物（NHSエステル）12.2mg（蛋白質1モル当たり25モル）を加え、4°Cで一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム

（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.8mlのSP Sepharose F.F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製した。目的画分を濃縮し、1.1mg/mlの目的物を含む溶液110 μ lを取得した（収率19%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：40～45分（1～3分子結合体）

実施例18 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5PET(3UU)-rhG-CSF誘導体

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で3.1mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体0.5mlに、実施例6で得られた5PET(3UU)を12.2mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4°Cで一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム

（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-SepharoseF.F.カラム1.5ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)7.5mlで洗浄後、0.2～0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、1.2mg/mlの目的物を含む溶液0.75mlを得た（収率58.6%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：40.5分（1分子結合体）

37.8分（2分子結合体）

実施例19 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5PET(3UA)-rhG-CSF誘導体

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で4.0mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体0.05mlに、実施例12と同様にして得られた5PET(3UA)のNHSエステル1.6mg（蛋白質1モルに対して10モル）を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム0.7ml

（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で洗浄後、0.2～0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.34mg/mlの目的物を含む溶液0.30mlを得た（収率56.7%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：42.3分（1分子結合体）

39.5分（2分子結合体）

実施例20 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5SUG(3UA)-rhG-CSF誘導体

実施例8で得られた化合物（5SUG(3UA)）100mg（6.7 μ mol）に、2.3mgのNHSと4.1mgのDCCを加え、氷冷下1mlの塩化メチレンに溶解し、氷冷下1時間、室温で1.5時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥

し、実施例8の化合物のNHSエステルを76.6mg得た（収率76.6％）。

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で3.9mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体0.1mlに、上記の活性化した化合物（NHSエステル）10.7mg(蛋白質1モルに対して35モル)を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-SepharoseF.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で洗浄後、0.2～0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.28mg/mlの目的物を含む溶液0.39mlを得た（収率27.8％）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：43.0分（1分子結合体）

40.4分（2分子結合体）

実施例21 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ヒトCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号：5PET(3UM)-hSOD

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で調製したCu, Zn型hSOD溶液（CELLULAR PRODUCTS, INC.製）0.5ml(1.34mg/ml)に、実施例5で得られた5PET(3UM)3.1mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH3.5）に緩衝液交換した。これをSP-SepharoseF.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.5)で洗浄後、0.5～1.0mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.33mg/mlの目的物を含む溶液0.62mlを得た（収率30.6％）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：41.1分（1分子結合体）

実施例22 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾抗GD3キメラ抗体の製造

略号：5PET(3UA)-KM871

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で1.1mg/mlに調製した抗GD3キメラ抗体(KM-871)溶液1.0ml（特開平5-304989に従って調製）に、実施例12と同様にして得られた5PET(3UA)のNHSエステル0.6mg(蛋白質1モルに対して5モル)を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液1.0mlをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをCM-Sepharose F.F.カラム1.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で洗浄後、0.25～1.0mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.52mg/mlの目的物を含む溶液430 μ lを得た（収率20.4%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～2分子結合体のバンドを確認した。

実施例23 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5PET(3URa)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で2.35mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体0.6mlに、実施例7の化合物（5PET(3URa)）56.3mg(蛋白質1モルに対

して50モル)および120mmol/Lに調製した NaBH_3CN 水溶液10 μl を加え、4°Cで一昼夜反応させた。反応液を塩酸で酸性にして反応を停止し、反応液をSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)に付し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に緩衝液交換した。これをSP Sepharose F.F.カラム1.4ml (Amersham-Pharmacia Biotech社)に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)で洗浄後、0.1~0.2mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.24mg/mlの目的物を含む溶液0.55mlを得た(収率8.5%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：41.2分(1分子結合体)

参考例1 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール(従来型試薬)修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の調製

略号：PEG₂Lys-rhIFN- β

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.8)で調製した参考例4で得られるrhIFN- β 溶液1.3ml(0.97mg/ml)へ、PEG₂Lys(平均分子量10,000、Shearwater polymers, Inc.製) 8.3mg(蛋白質1モルに対して12.5モル)を加え、4°Cで一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)に付し、エチレングリコールを含む20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH6)に緩衝液交換した。これをCM-SepharoseF.F.カラム1.4ml (Amersham-Pharmacia Biotech社)に通塔し、エチレングリコールを含む20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH6)で洗浄後、0.1~0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、0.36mg/mlの目的物を含む溶液2.7mlを得た(収率76.7%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：45.3分（1分子結合体）

41.5分（2分子結合体）

参考例2 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール（従来型試薬）修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：PEG₂Lys-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で4.0mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体0.5mlに、PEG₂Lys（平均分子量10,000、Shearwater Polymers, Inc.製）10.6mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム2.0ml

（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）10mlで洗浄後、0.2～0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、1.05mg/mlの目的物を含む溶液0.5mlを得た（収率26.3%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：44.3分（1分子結合体）

41.7分（2分子結合体）

参考例3 5kDa 1本鎖型ポリエチレングリコール（従来型試薬）修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の調製

略号：PEG₂Lys-rhG-CSF

等張りん酸緩衝液(pH7.4)で4.4mg/mlに調製した参考例6で得られるrhG-CSF溶液0.5mlに、PEG₂Lys（平均分子量10,000、Shearwater Polymers, Inc.製）11.7mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4°Cで一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）に付し、20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム2.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)10mlで洗浄後、0.2～0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後、濃縮し、1.78mg/mlの目的物を含む溶液0.5mlを得た（収率40.5%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例9と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例9と同様にして分析した。

保持時間：44.2分（1分子結合体）

41.8分（2分子結合体）

参考例4 組換え型ヒトインターフェロン-β（未修飾rhIFN-β）の調製

配列番号1に示したアミノ酸配列を有するrhIFN-βは水上ら[Biotechnology Letter、第8巻、605頁（1986年）]、および久我ら[現代化学増刊12：医学における遺伝子工学、135頁（1986年）、東京化学同人]の方法に従って製造した。

rhIFN-βをコードするDNAを含むプラスミドpMG-1を保有する大腸菌K-12株をLGTrpAp培地（バクトトリプトン10g/l、酵母エキス5g/l、塩化ナトリウム5g/l、グルコース1g/l、L-トリプトファン50mg/l、アンピシリン50μg/l）でシード培養した。rhIFN-βの生産には2リッタージャー発酵槽でMCGAp培地（M9培地にカザミノ酸0.5%、アンピシリン50μg/mlを添加）を用い、グルコース濃度を1%に、pHを6.5に維持して数日間20°Cで培養した。なお、培養液は750rpmで振とうし、毎分1Lでエアレーションした。培養液から凍結融解法 [DNA、2巻、265頁（1983年）] で抽出液

を調製した。さらに、菌体残渣から特開昭61-69799に開示された方法に従ってrhIFN- β を得た。

参考例5 組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体（未修飾rhG-CSF誘導体）の調製

配列番号2に示したアミノ酸配列を有するhG-CSFの1番目のスレオニンをアラニンに、3番目のロイシンをスレオニンに、4番目のグリシンをチロシンに、5番目のプロリンをアルギニンに、17番目のシステインをセリンにそれぞれ置換したrhG-CSF誘導体を、特公平7-96558に記載の方法により取得した。

上記のrhG-CSF誘導体をコードするDNAを含むプラスミドpCfBD28を保有する大腸菌W3110strA株（*Escherichia coli* ECfBD28 FERM BP-1479）をLG培地〔バクトトリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5g、グルコース1gを水1Lに溶かし、NaOHでpHを7.0とする〕で37°C、18時間培養し、この培養液5mlを25 μ g/mlのトリプトファンと50 μ g/mlのアンピシリンを含むMCG培地（ Na_2HPO_4 0.6%、 KH_2PO_4 0.3%、塩化ナトリウム0.5%、カザミノ酸0.5%、 MgSO_4 1mmol/L、ビタミンB 14 μ g/ml、pH7.2）100mlに摂取し、30°Cで4～8時間培養後、トリプトファンの誘導物質である3 β -インドールアクリル酸（3 β -indoleacrylic acid、以下IAAと略す）を10 μ g/ml加え、さらに2～12時間培養を続けた。培養液を8,000rpmで、10分間遠心して集菌し、30mmol/L塩化ナトリウム水溶液、30mmol/Lトリス・塩酸緩衝液（pH7.5）で洗浄した。洗浄菌体を上記緩衝液30mlに懸濁し、0°Cで10分間超音波破碎（BRANSON SONIC POWER COMPANY社、SONIFIER CELL DISRUPTOR 200、OUTPUT CONTROL 2）した。該超音波破碎物を9,000rpmで30分間遠心分離して菌体残渣を得た。

菌体残渣からマーストンらの方法〔バイオ・テクノロジー（BIO/TECHNOLOGY）、第2巻、800頁（1984年）〕に準じ、rhG-CSF誘導体を抽出・精製・可溶化・再生した。

参考例6 組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子（未修飾rhG-CSF）の調製

配列番号2に示したアミノ酸配列を有するrhG-CSFを参考例5に記載した方法に準じて調製した。

試験例1 化学修飾インターフェロン- β の抗ウイルス活性

実施例9、10、12および13で得られた化学修飾rhIFN- β および未修飾rhIFN- β の抗ウイルス活性を下記のニュートラルレッド (NR) 取り込み法で調べた。

<NR取り込み法>

小長谷らの方法〔蛋白質核酸酵素 (別冊)、335頁 (1981年)〕を参考に、抗ウイルス活性を測定した。

すなわち、滅菌したトランスファープレートに5%ウシ胎児血清 (FBS) 添加イーグルMEM培地を添加した。次に、IFN国内標準品 [α (ミドリ十字)、 β (東レ) および γ (ミドリ十字)] 溶液を各々50 μ lずつウェルに分注し、2倍ずつの段階希釈を行った。一方、所定の濃度に培地で調製した化学修飾IFNまたは未修飾IFN溶液も同様に50 μ lずつウェルに分注した。これらの溶液を、所定の細胞数のヒト羊膜由来の株化細胞 (FL細胞) を入れた96穴プレートにトランスし、数秒間攪拌した。37°Cにて一昼夜、CO₂インキュベーターで培養し、抗ウイルス状態を作った。

次に、培養液を除去した後、ウイルス溶液を添加し、37°Cにて2日間、CO₂インキュベーターで培養しウイルスを感染させた。IFNにより細胞の抗ウイルス状態が変化し、細胞変性が起こった。続いて、培養液を除去し、ニュートラルレッド

(NR) 溶液を添加した。37°Cにて1時間CO₂インキュベーターに放置し、NR溶液を除去した。等張りん酸緩衝液でウェルを洗浄し、抽出液 (0.01mol/L塩酸-30%エタノール) を添加し、2~3分間攪拌した。

NRにより生き残った細胞を染色し、抽出後、492nmでの吸光度を測定し、定量曲線をプロットした。定量曲線より算出した未修飾IFNの活性を100%としたときの化学修飾IFNの相対活性を算出した。

各IFN- β の比活性を第5表および第6表に示す。

第5表 化学修飾組換え型ヒト IFN- β の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例	相対活性 (%)
未修飾 rhIFN- β	—	100
5TRC(3UA)-rhIFN- β	9	58
5SKA(3UA)-rhIFN- β	10	93
5PET(3UA)-rhIFN- β	12	50

第6表 化学修飾組換え型ヒト ^{17}Ser IFN- β の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例	相対活性 (%)
未修飾 ^{17}Ser rhIFN- β	—	100
5PET(3UA)- ^{17}Ser rhIFN- β	13	115

第5表および第6表の結果より、本発明に係る化学修飾IFN- β はいずれも抗ウイルス活性を保持していることが確認された。

試験例2 化学修飾インターフェロナー α の抗ウイルス活性

実施例14で得られた化学修飾rhIFN- α および未修飾rhIFN- α の抗ウイルス活性を試験例1に示したNR取り込み法で調べた。

各IFN- α を濃度1 $\mu\text{g/ml}$ で作用させたときの活性を第7表に示す(未修飾IFN- α の活性を100%として表示した)。

第7表 化学修飾組換え型ヒト IFN- α の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	相対活性 (%)
未修飾 rhIFN- α	—	1	100
5PET(3UA)-rhIFN- α	14	1	100

試験例3 化学修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体のマウス白血病細胞NFS60に対する増殖促進作用

実施例15~20の化合物、未修飾rhG-CSF誘導体、および未修飾rhG-CSFのマウス

白血病細胞NFS60 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻、6687頁 (1985年)] に対する増殖促進活性を、浅野らの方法 [薬理と治療、19巻、2767頁 (1991年)] に従って測定した。

各化合物を100ng/mlの濃度で細胞に作用させたときの結果を未修飾のポリペプチドの活性を100%として第8表および第9表に示す。

第8表 化学修飾 rhG-CSF 誘導体の NFS60 細胞増殖促進活性

化合物略号	実施例	濃度 (ng/ml)	相対活性 (%)
未修飾 rhG-CSF 誘導体	—	100	100
5SKA(3UA)-rhG-CSF 誘導体	15	100	100
5QNA(4UA)-rhG-CSF 誘導体	16	100	100
5PET(3UU)-rhG-CSF 誘導体	18	100	100
5PET(3UA)-rhG-CSF 誘導体	19	100	100
5SUG(3UA)-rhG-CSF 誘導体	20	100	100

第9表 化学修飾 rhG-CSF の NFS60 細胞増殖促進活性

化合物略号	実施例	濃度 (ng/ml)	相対活性 (%)
未修飾 rhG-CSF	—	100	100
5SKA(3UA)-rhG-CSF	17	100	100

第8表および第9表の結果より、本発明に係る化学修飾rhG-CSF誘導体および化学修飾rhG-CSFはいずれもNFS60細胞に対する増殖促進作用を維持していることが確認された。

試験例4 化学修飾スーパーオキシドディスムターゼの酵素活性

実施例21で調製した化学修飾SODの酵素活性をMccord, J.M.とFridovich, I.のキサントン-キサンチンオキシダーゼ-シトクロムC系 [ザ ジャーナル オブ バイ

オロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、244巻、6049頁 (1969年)] で測定した。SOD活性1ユニット (U) とは、pH 7.8、30℃下で、シトクロムCの還元速度を50%阻害するSODの酵素量を示し、以下の式で算出した。

$$\text{比活性 (U/mg)} = \left(\frac{\text{ブランク}}{\Delta A/\text{分}} - 1 \right) \times \frac{1}{0.000256}$$

化学修飾ヒトSODの酵素活性を第10表に示す。

SOD 50U/ml=0.000256mg (3900U/mgの場合)

$\Delta A/\text{分}$: 測定値

第10表 化学修飾ヒト Cu, Zn 型スーパーオキシド
ディスムターゼの酵素活性

化合物名	実施例	相対活性 (%)
未修飾 hSOD	—	100
5PET(3UM)-hSOD	21	50

※活性は未修飾 hSOD の酵素活性を 100%とした相対活性で表示した。

第10表より、本発明に係る化学修飾hSODは酵素活性を維持していることが確認された。

試験例5 化学修飾抗GD3キメラ抗体の結合活性

実施例22で調製した化学修飾抗GD3キメラ抗体 (5PET(3UA)-KM871) の結合活性をKenya.Sらの方法 [キンサー イミュノロジー アンド イミュノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.)、36巻、373頁 (1993年)] に基づいて測定した。

未修飾抗体および化学修飾抗GD3キメラ抗体（5PET(3UA)-KM871）の $3.3\mu\text{g/ml}$ の濃度におけるGD3結合活性を第11表に示す。

活性は、未修飾の抗GD3キメラ抗体の結合活性を100%としたときの相対活性で示した。

第11表 化学修飾抗体のGD3結合活性

化合物名	実施例	相対結合活性 (%)
未修飾抗体	—	100
5PET(3UA)-KM871	22	86.3

第11表より、本発明に係る化学修飾抗GD3キメラ抗体（5PET(3UA)-KM871）でGD3への結合活性が維持されていることが確認された。

試験例6 化学修飾インターフェロン- β の血中半減期延長効果

実施例9で得られた5TRC(3UA)-rhIFN- β 、参考例1で得られたPEG₂Lys-rhIFN- β 、および参考例4で得られた未修飾rhIFN- β を等張りん酸緩衝液で $12.5\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製し、8～10週齢のBALB/C雄性マウス（日本チャールズリバー）に $200\mu\text{l}$ ずつ静脈内注射した。経時的にマウスを殺し血清を採取し、ELISA法により血中のIFN- β の濃度を算出した。

その結果を図1に示す。

未修飾IFN- β が投与後1時間で検出限界以下になったのに対し、化学修飾IFN- β では数時間後も血中濃度が維持され、大幅な持続性が付与された。

また、本発明で開示された化合物、すなわち3本鎖分岐型ポリエチレングリコール類で修飾されたrhIFN- β は、2本鎖分岐型ポリエチレングリコール類で修飾されたrhIFN- β に比較してより血中持続性に優れ、高い血中濃度推移を示した。

試験例7 化学修飾rhG-CSF類の血中半減期延長効果

実施例15で得られた5SKA(3UA)-rhG-CSF誘導体、実施例17で得られた5SKA(3UA)

-rhG-CSF、参考例2で得られたPEG₂Lys-rhG-CSF誘導体、参考例3で得られたPEG₂Lys-rhG-CSF、参考例5の未修飾rhG-CSF誘導体、参考例6の未修飾rhG-CSFを雄性ラットに0.1mg/kgの投与量で静脈内注射し、経時的に尾静脈より血液を採取した。適宜希釈し、ELISAにて血中の化合物濃度を測定した。2回の実験を行って得られた結果を図2に示す。

未修飾G-CSF類に対し、化学修飾G-CSF類では大幅に高い血中濃度が維持された。さらに、本発明で開示された化合物、すなわち、3本鎖分岐型ポリエチレングリコール類で修飾されたrhG-CSF類は従来の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール類で修飾された化合物に比べてより血中持続性に優れていることが確認された。

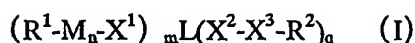
産業上の利用可能性

本発明で開示された新規な分岐型の構造を有するポリアルキレングリコール類は生理活性ポリペプチド類の化学修飾試剤として有用である。さらに、該ポリアルキレングリコール修飾生理活性ペプチドは非修飾ペプチドと同様の生物活性を保持しているだけでなく、体内に投与されたときに長時間有効にその生理活性を示し、当該生理活性に関連した症状の改善剤、治療剤として有用である。

請求の範囲

1. 1本鎖ポリアルキレングリコール類が3本以上結合し、かつ、ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類。

2. 式 (I)



{式中、Lは4以上分岐が可能な基を表し、

Mは OCH_2CH_2 、 $OCH_2CH_2CH_2$ 、 $OCH(CH_3)CH_2$ 、 $(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s$ (式中、rおよびsは同一または異なって、任意の正の整数を表す) または

$(OCH_2CH_2)_{ra}-[OCH(CH_3)CH_2]_{sa}$ (式中、raおよびsaはそれぞれ前記rおよびsと同義である) を表し、

nは任意の正の整数を表し、

mは3以上の整数を表し、

qは1~3の整数を表し、

R^1 は水素原子、低級アルキルまたは低級アルカノイルを表し、

R^2 はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表し、

X^1 は結合、O、S、アルキレン、 $(OCH_2)_{ta}$ (式中、taは1~8の整数を表す)、 $(CH_2)_{tb}O$

(式中、tbは前記taと同義である)、 NR^3 (式中、 R^3 は水素原子または低級アルキルを表す)、 $R^4-NH-C(=O)-R^5$ [式中、 R^4 は結合、アルキレンまたは $O(CH_2)_{tc}$ (式中、

tcは前記taと同義である) を表し、 R^5 は結合、アルキレンまたは OR^{5a} (式中、 R^{5a} は

結合またはアルキレンを表す) を表す]、 $R^6-C(=O)-NH-R^7$ [式中、 R^6 は結合、アルキレンまたは $R^{6a}O$ (式中、 R^{6a} は前記 R^{5a} と同義である) を表し、 R^7 は結合、アルキ

レンまたは $(CH_2)_{td}O$ (式中、tdは前記taと同義である) を表す]、 $R^8-C(=O)-O$ (式中、

R^8 は前記 R^{5a} と同義である) または $O-C(=O)-R^9$ (式中、 R^9 は前記 R^{5a} と同義である)

を表し、

X^2 は結合、Oまたは $(CH_2)_{te}O$ （式中、 te は前記 ta と同義である）を表し、

X^3 は結合またはアルキレンを表し、

3つ以上の $R^1-M_r-X^1$ はそれぞれ同一でも異なってもよく、 $X^2-X^3-R^2$ が2または3個存在する場合（ q が2または3である場合）には、それらは同一でも異なってもよい}で表わされる分岐型ポリアルキレングリコール類。

3. q が1である請求の範囲第2項記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

4. m が3または4である請求の範囲第2項記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

5. n が10~100,000であり、 r および s 並びに ra および sa が同一または異なって、1~100,000である請求の範囲第2項~第4項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

6. R^2 が水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホニル、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アルカノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレシル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィドまたはアジドである請求の範囲第2項~第5項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

7. 分子量が500~1,000,000である請求の範囲第1項~第6項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

8. L がトリシンから水素原子4個以上を除いた基、シキミ酸から水素原子4個以上を除いた基、キナ酸から水素原子4個以上を除いた基、エリスリトールから水素原子4個以上を除いた基、ペンタエリスリトールから水素原子4個以上を除いた基およびグルコースから水素原子4個以上を除いた基から選ばれる基である請求の範囲第1項~第7項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

9. 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、少なくとも1個の請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類で直接もしくはスパーサーを介して修飾された化学修飾ポリペプチド。

10. 生理活性ポリペプチドが酵素、サイトカインまたはホルモンである請求の範囲第9項記載の化学修飾ポリペプチド。

11. 請求の範囲第9項または第10項記載の化学修飾ポリペプチドを含有する医薬。

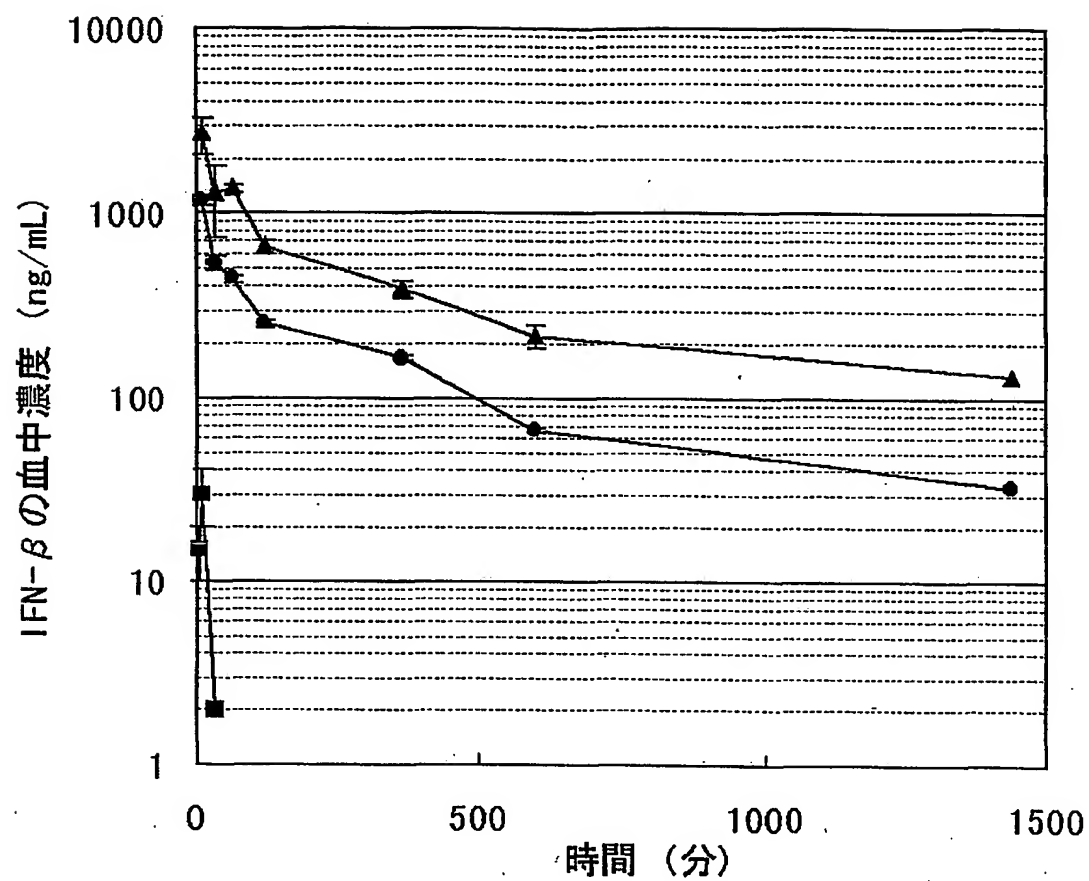


図 1

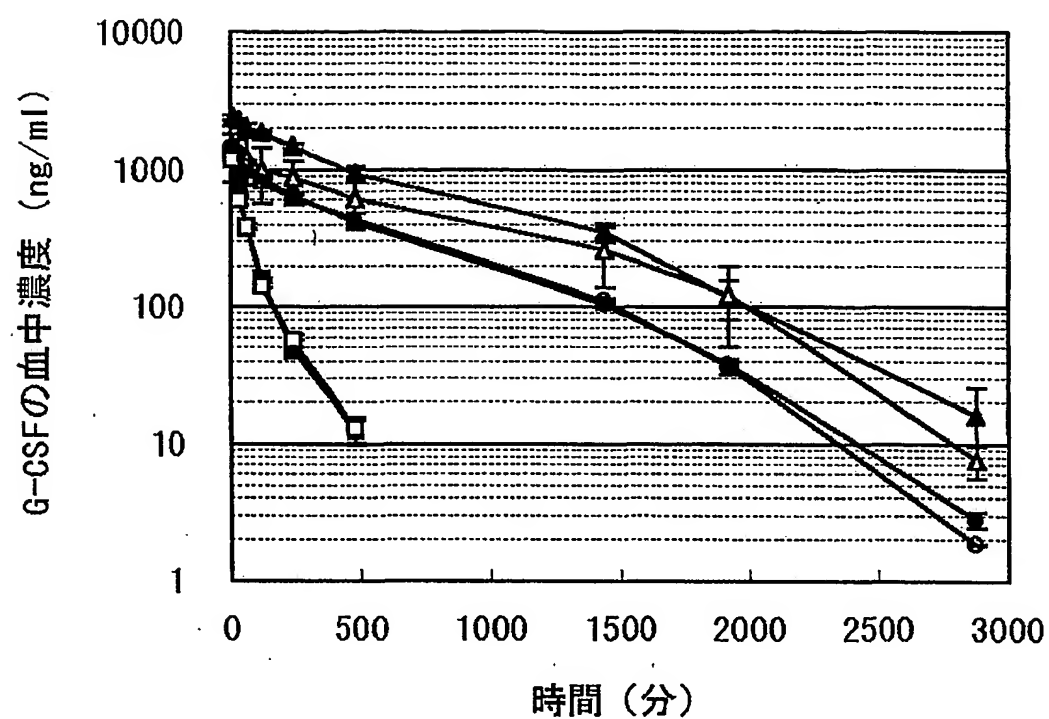


図 2

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel branched polyalkylene glycol derivatives

<130> 11362WO1

<140>

<141>

<150> JP 2001/21616

<151> 2001-01-30

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> Hominidae

<400> 1

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Leu Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Thr Gly Arg
 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> Hominidae

<400> 2

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 -1 1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
 50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
 65 70 75

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
 80 85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
 115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
 130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
 145 150 155

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
160 165 170

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00709

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C08G65/329, C07K14/535, C07K14/56, C07K14/565, C07K16/18, A61K38/02, A61K38/43, A61K38/19, A61K38/22, A61K47/34, A61K47/48, C12N9/02 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C08G65/329-65/337, C12N9/02-9/08, C07K14/53-14/57, C07K16/18-16/36, A61K38/00-38/58, A61K47/34, A61K47/48 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/45964 A (Shearwater Polymers, Inc.), 16 September, 1999 (16.09.99), Claims & JP 2002-506087 A & EP 884341 A & US 6111048 A	1-11
X	WO 99/43343 A (Supratek Pharma Inc.), 02 September, 1999 (02.09.99), Claims & JP 2002-504519 A & EP 619730 A & US 5698529 A	1-11
X	EP 839849 A (Nof Corp.), 06 May, 1998 (06.05.98), Claims & JP 10-139877 A Claims & DE 69703780 T & US 5767284 A	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 April, 2002 (22.04.02)		Date of mailing of the international search report 21 May, 2002 (21.05.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00709

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5872191 A (Nof Corp.), 12 August, 1998 (12.08.98), Claims & JP 10-139878 A Claims & EP 839850 A	1-11
X	WO 95/11924 A (Enzon, Inc.), 04 May, 1995 (04.05.95), Claims & JP 09-504299 A Claims & EP 788515 A & US 5919455 A	1-11
A	WO 97/10281 A (Bracco S. P. A.), 20 March, 1997 (20.03.97), Claims & JP 11-514396 A Claims & DE 860262 A & US 5807971 A	1-11
P,A	JP 2001-64383 A (Japan Science and Technology Corp.), 13 March, 2001 (13.03.01), Claims (Family: none)	1-11
A	JP 2000-191700 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 11 July, 2000 (11.07.00), Claims (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C08G 65/329, C07K 14/535, C07K 14/56, C07K 14/565, C07K 16/18, A61K 38/02, A61K 38/43, A61K 38/19, A61K 38/22, A61K 47/34, A61K 47/48, C12N 9/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C08G 65/329-65/337, C12N 9/02-9/08 C07K 14/53-14/57, C07K 16/18-16/36 A61K 38/00-38/58, A61K 47/34, A61K 47/48		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2002年 日本国実用新案登録公報 1996-2002年 日本国登録実用新案公報 1994-2002年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 99/45964 A (シアウオーター・コーポレイション) 1999. 09. 16 特許請求の範囲 & JP 2002-506087 A & EP 884341 A & US 6111048 A	1-11
X	WO 99/43343 A (スプラテック ファーマ インコーポレイテッド) 1999. 09. 02 特許請求の範囲 & JP 2002-504519 A & EP 619730 A & US 5698529 A	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22. 04. 02		国際調査報告の発送日 21.05.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 藤本 保 (印) 4 J 2940 電話番号 03-3581-1101 内線 3493

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 839849 A (NOF CORPORATION) 1998.05.06 Claims & JP 10-139877 A 特許請求の範囲 & DE 69703780 T & US 5767284 A	1-11
X	US 5872191 A (NOF CORPORATION) 1998.08.12 Claims & JP 10-139878 A 特許請求の範囲 & EP 839850 A	1-11
X	WO 95/11924 A (ENZON, INC.) 1995.05.04 Claims & JP 09-504299 A 特許請求の範囲 & EP 788515 A & US 5919455 A	1-11
A	WO 97/10281 A (BRACCO S. P. A.) 1997.03.20 Claims & JP 11-514396 A 特許請求の範囲 & DE 860262 A & US 5807971 A	1-11
PA	JP 2001-64383 A (科学技術振興事業団) 2001.03.13 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2000-191700 A (協和醗酵工業株式会社) 2000.07.11 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-11